Zellhülle und Zellform von Escherichia coli K12: Organisation der Proteine in der äußeren Membran.

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

dem Fachbereich Biologie
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Ingo Haller
aus Pforzheim

1975

1974

Zellhülle und Zellform von Escherichia coli K12: Organisation der Proteine in der äußeren Membran.

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

dem Fachbereich Biologie
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Ingo Haller
aus Pforzheim

1975

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 19. Dezember 1974

Dekan: Prof. Dr. F.-W. Bentrup

1. Berichterstatter: Prof. Dr. U. Henning

2. Berichterstatter: Prof. Dr. V. Braun

Herrn Prof. Dr. U. Henning danke ich für die Überlassung des Themas dieser Dissertation, für sein andauerndes Interesse und viele wertvolle Anregungen sowie für die Durchführung der Aminosäure-Analysen. Fräulein I. Sonntag danke ich für die elektronenmikroskopischen Aufnahmen, Fräulein B. Höhn und Herrn H. Mett für die Unterstützung bei einigen Versuchen. Mein Dank gilt außerdem Herrn E. Freiberg, der die Zeichnungen anfertigte und nicht zuletzt Frau M. Danner für die sorgfältige Reinschrift. Der Max-Planck-Gesellschaft danke ich für die Gewährung eines Stipendiums.

INHALTSVERZEICHNIS

1.	Einleitung	1
2.	Material und Methoden	11
2.1	Organismen, Medien und Wachstumsbedingungen	11
2.1.1	Bakterienstämme	11
2.1.2	Medien und Wachstumsbedingungen	11
2.2	Präparative Methoden	14
2.2.1	Zellhülsen	14
2.2.2	Zellhüllen	15
2.2.3	Extraktion des Phospholipids	16
2.2.4	Trypsin-Behandlung ganzer Zellen	16
2.2.5	Kinetik der Trypsineinwirkung	16
2.2.6	Trägergebundenes Trypsin	17
2.2.7	Isolierung von Minizellen, Aufschluß durch Ultraschall	18
2.2.8	Quervernetzung mit Diimidoestern	19
2.2.9	Quervernetzung mit Glutarladehyd	21
2.2.10	"Oxydationshülsen"	21
2.2.11	Jodacetamid-Behandlung	23
2.3	Analytische Methoden	23
2.3.1	Ammonolyse	23
2.3.2	SDS-Gelelektrophorese	24
2.3.3	Molekulargewichtsbestimmung	25
2.3.4	Weitere analytische Methoden	26
2.4	Chemikalien	28
3.	Ergebnisse	30
3.1	Zwei Klassen von Proteinen in "Hülsen ohne Trypsin"	30

3.2	Rundumvernetzung mit Diimidoestern	34
3.2.1	Die Vernetzungsreaktion	34
3.2.2	Rundumvernetzung von intakten Zellen und "Hülsen ohne Trypsin"	35
3.2.3	Zusammensetzung von rundum vernetzten Hülsen	39
3.2.4	Rundumvernetzung bei niedrigen Temperaturen	46
3.3	Teilvernetzung von Hülsen und "Hülsen ohne Trypsin" mit Diimidoestern	47
3.3.1	Markierung des Lipoproteins mit ^{14}C-Palmitinsäure	49
3.3.2	Konzentrationsabhängigkeit und Kinetik der Teilvernetzung von Hülsen	50
3.3.3	Konzentrationsabhängigkeit der Teilvernetzung von "Hülsen ohne Trypsin"	55
3.3.4	Konzentrationsabhängigkeit der Teilvernetzung von Pronase-behandelten Hülsen	61
3.3.5	Teilvernetzung von intakten Zellen	66
3.3.6	Scheinbares Molekulargewicht der Vernetzungsprodukte (a), (b) und (c)	68
3.4	Teilvernetzung von Hülsen der temperatur-sensitiven rod-Mutante lss12	75
3.5	Versuche mit Minizellen und stäbchenförmigen Zellen des Stammes P678-54: Hülsenpräparation, mikrodensitometrische Messung der Hauptbanden, Teilvernetzung mit Diimidoestern	77
3.6	Vernetzung von Hülsen mit Glutaraldehyd	81

3.7	Oxydative Verknüpfung von Proteinen der äußeren Membran zu SDS-resistenten, zellförmigen Hülsen ("Oxydationshülsen")	86
3.7.1	Oxydation von Zellhülsen	87
3.7.2	Zusammensetzung der "Oxydationshülsen"	90
3.7.3	Lokalisation der "oxydierbaren Proteine"	91
3.7.4	Anordnung der "oxydierbaren Proteine" in der nativen äußeren Membran	94
4.	Diskussion	99
4.1	Rundumvernetzung	99
4.2	Teilvernetzung von Präparationen des Stammes 3282	108
4.3	Weitere Vernetzungsversuche mit Diimidoestern und Glutaraldehyd	111
4.4	"Oxydierbare Proteine"	112
5.	Zusammenfassung	118
6.	Literaturverzeichnis	121
7.	Abkürzungen	132

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546514_0033

1. EINLEITUNG

Die Biologie als Naturwissenschaft war in ihren Anfängen beschreibende Morphologie. Obwohl inzwischen durch Biochemie, Genetik und Molekularbiologie neue Dimensionen eröffnet wurden, ist die Morphogenese von Organismen und Organen weitgehend unverstanden geblieben. Selbst über die molekularen Grundlagen der Zellform von Bakterien - einige ihrer Vertreter können immerhin als die besterforschten Lebewesen gelten - herrscht noch Unklarheit.

"Self assembly" und "sequential assembly" spielen als Konstruktionsmechanismen eine entscheidende Rolle bei der Entstehung von Viren, Bakteriophagen und zahlreichen subzellulären Strukturen. KUSHNER (51) berichtet von entsprechenden Befunden bei Pili und Geißeln von Bakterien, Flagellen und Cilien von Eukaryonten, bei Ribosomen, Actin und Myosin, bei Microtubuli, die sich unter anderem im Spindelapparat der mitotischen Teilung finden, sowie den Aggregaten von Fibrin, die zur Blutgerinnung führen.

Von "self assembly" spricht man, wenn die Struktur des Endprodukts allein durch die Aminosäuresequenz der beteiligten Polypeptidketten festgelegt wird. Beim "sequential assembly" kann gemäß der ursprünglichen Definition (94) die Zusammenlagerung in Anwesenheit aller Untereinheiten nur durch eine be-

stimmte Reihenfolge verschiedener Vorgänge erfolgen. Inzwischen wurde klar, daß hierbei Untereinheiten auch enzymatisch modifiziert werden, sobald eine bestimmte Stufe der Zusammenlagerung erreicht ist (48,52). Mit anderen Worten, beim "sequential assembly" ist neben der Primärstruktur der Untereinheiten weitere Information in bestimmten Phasen des Prozeßablaufs notwendig. Auf diese Weise können so komplexe Gebilde wie der Bakteriophage T4 entstehen. HENNING und SCHWARZ gehen in ihren grundsätzlichen Überlegungen zur Morphogenese von Bakterien (38) davon aus, daß a priori neben "self assembly" und "sequential assembly" weitere Bauprinzipien nicht unbedingt notwendig erscheinen, um die genetische Information über die Zellform zu verwirklichen.

Die Frage nach der Zellform ist bei Bakterien gleichbedeutend mit der Frage nach der Form der Zellwand. Die Zellhülle von Escherichia coli ist morphologisch (23) und chemisch (61) gut erforscht. Sie besteht wie bei anderen gramnegativen Bakterien aus drei Schichten (23,58,59,71): Die Cytoplasmamembran innen bildet die Hauptpermeabilitätsschranke der Zelle und enthält unter anderem die Enzyme der Atmungskette (56,63), Transportsysteme (63) und Enzyme für die Synthese von Phospholipid (4,93), Murein (82) und Lipopolysaccharid (62). Es folgt das Murein (auch Peptidoglycan, Mucopeptid oder Glyko-

peptid genannt), ein ringsum kovalent geschlossenes, ein- oder zweischichtiges Netz ("Sacculus") von Aminozuckerketten, die durch kurze Peptidbrücken miteinander verknüpft sind (11,86,90). Die äußere Membran schließt die Zelle nach außen hin ab. Sie weist ein anderes Proteinmuster als die Cytoplasmamembran auf (63,74) und enthält Rezeptoren für Bakteriophagen (22,81) und Colicine (70,92) sowie das gesamte Lipopolysaccharid; dieses ist für die Antigen-Eigenschaften gramnegativer Bakterien verantwortlich. Phospholipasen sind die einzigen bisher in der äußeren Membran gefundenen Enzyme (63,72,93). Im Gegensatz zur Cytoplasmamembran ist die äußere Membran am Murein verankert. Die Verknüpfung erfolgt über ein Lipoprotein, das einerseits kovalent am Murein gebunden ist, andererseits hydrophobe Wechselwirkung mit der äußeren Membran eingeht (12,13,14).

HENNING und SCHWARZ kommen zu dem Schluß (38), daß das Murein aufgrund fehlender Spezifität nicht allein die formbestimmende Funktion erfüllen kann, die ihm lange Zeit zugeschrieben wurde. Zweifellos trägt es zur Stabilität der Zellhülle entscheidend bei. Der in einem stäbchen-, kugel- oder spirillenförmigen Sacculus niedergelegte Informationsgehalt muß aber primär von anderen Zellelementen stammen. Zwei Kandidaten bieten sich an: 1.) die an der Synthese des Sacculus betei-

ligten Enzyme und 2.) eine Matrix, der das Murein bei der Synthese aufgelagert werden könnte. Im ersten Fall könnten räumliche Anordnung, Spezifität und Unterschiede in den relativen Aktivitäten der Enzyme die Form des Sacculus direkt beeinflussen.

Für den einfachsten Fall einer formgebenden Matrix - darüber hinaus sind natürlich vielerlei Wechselwirkungen und strukturelle Besonderheiten denkbar - kommen als Bausteine nur die Proteine der Cytoplasmamembran oder der äußeren Membran in Frage (38). Für die letzteren spricht, daß in der äußeren Membran wenige Proteine den Großteil des gesamten Proteinanteils ausmachen und somit als Strukturproteine geeignet erscheinen (8,73,74). Außerdem dürfte sich die Funktion der Proteine in der äußeren Membran wohl kaum in den wenigen bisher erkannten Aufgaben (Phospholipase-Aktivitäten, Rezeptoren für Phagen und Colicine) erschöpfen.

Einen stärkeren Hinweis auf die Existenz einer Proteinmatrix liefern jedoch neuere Arbeiten von HENNING et al. (35,37), in denen die Präparation von "Zellhülsen" beschrieben wird, die frei von Murein nur aus äußerer Membran bestehen und die Zellform beibehalten. Diese Zellhülsen enthalten 25% Phospholipid, 25-30% Lipopolysaccharid und 45-50% Protein. Durch SDS-Gelelektrophorese kann das Protein in vier Hauptbanden mit folgenden scheinbaren Molekulargewichten aufgetrennt

werden: I, 40 000; II, 28 000; III, 18 000; IV, 10 000. Polypeptid II entsteht als tryptisches Fragment während der Aufarbeitung aus II*, das ein scheinbares Molekulargewicht von etwas weniger als 40 000 aufweist. Bande IV enthält das Lipoprotein, das ursprünglich teils am Murein gebunden, teils frei in der Membran vorlag (40,45). Zwar ist die Homogenität der Banden I und II noch nicht völlig geklärt, doch können beide höchstens jeweils zwei verschiedene Polypeptidketten enthalten (8,25,26,57,76). Während der Anteil von Bande III verhältnismäßig gering ist und von Präparation zu Präparation schwankt, liegen die Polypeptide I, II und IV etwa im molaren Verhältnis 1-1,3:1:8-10 vor. Mit Chloroform-Methanol läßt sich das gesamte Phospholipid extrahieren, ohne daß dadurch die Morphologie der Hülsenmembran erkennbar verändert würde.

Diese Befunde deuten darauf hin, daß die äußere Membran tatsächlich eine Proteinmatrix enthält, in der die Polypeptide I und II* als sich wiederholende Untereinheiten ("repeating subunits") vorliegen. Eine Bestätigung dieser Hypothese erfordert aber detaillierte Untersuchungen über die Anordnung der Proteine in der äußeren Membran. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten Schritte in dieser Richtung unternommen werden. Vor allem galt es zu klären, inwieweit die von HENNING et al. (35,37) isolierten

Zellhülsen die Verhältnisse in der intakten Membran widerspiegeln.

Ein Forscher muß die Ergebnisse seiner Arbeit kritisch und unvoreingenommen prüfen. Trotzdem können Modelle - bei klarer Abgrenzung gegenüber den gesicherten Erkenntnissen - wertvolle Hilfestellung leisten und oft genug zu neuen Fragestellungen anregen. Für die vorliegende Arbeit sind in diesem Sinn zwei Membranmodelle von Bedeutung, die von SINGER und NICOLSON (79) bzw. CAPALDI und GREEN (16) entwickelt wurden. Beide beruhen auf der schon seit langem diskutierten Vorstellung (20), daß das Phospholipid in einer Doppelschicht angeordnet ist, wobei die polaren Gruppen nach außen zeigen und so die innere Lipidphase vom wässrigen Außenmedium trennen. Die Membranproteine können in zwei Klassen unterteilt werden: die peripheren Proteine ("extrinsic proteins") tragen ringsum polare Gruppen und sind der Doppelschicht aufgelagert (Abb. 1a). Die integralen Proteine ("intrinsic proteins") besitzen auf ihrer Oberfläche neben polaren auch hydrophobe Bereiche, mit denen sie in die Lipidphase der Membran ragen oder diese durchdringen (Abb. 1b und 1c).

Der Hauptunterschied zwischen beiden Modellen betrifft die großräumige Anordnung der Proteine. Während das "fluid-mosaic-Modell" von SINGER und NICOLSON annimmt,

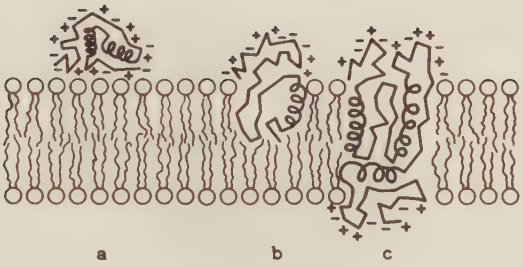


Abb. 1 Anordnung peripherer (a) und integraler (b,c) Proteine innerhalb der Membran, dargestellt an einem schematischen Querschnitt durch die Phospholipid-Doppelschicht. Die Kreise repräsentieren den polaren, die Wellenlinien den hydrophoben Teil der Phospholipid-Moleküle. Modifiziert nach (79).

daß die Proteine ohne Wechselwirkung untereinander gleichsam wie Inseln in der flüssigen Lipidphase schwimmen (keine "long-range order") (Abb. 2), fordern andererseits CAPALDI und GREEN solche Proteinwechselwirkungen über weite Bereiche als Bauprinzip der Membran (Abb. 3). Hier füllt das Phospholipid gewissermaßen die Lücken im Proteingerüst.

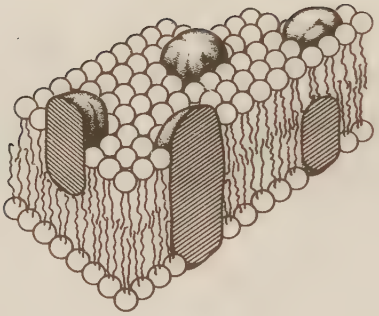


Abb. 2

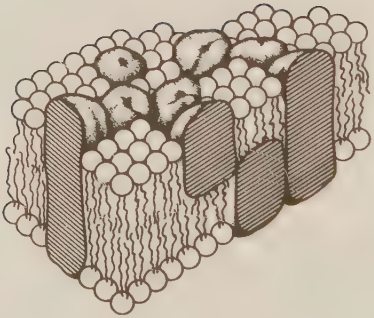


Abb. 3

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe Protein-quervernetzender Agentien versucht, eine Entscheidung zu treffen, welches der beiden Modelle die Feinstruktur der äußeren Membran von E. coli besser charakterisiert. Alle Ergebnisse sprechen dafür, daß diese Membran in extremer Weise dem von CAPALDI und GREEN vorgeschlagenen Typ entspricht: Mit verschiedenen Agentien konnten zwei Klassen von Proteinen unterschieden werden; die Proteine jeder Klasse sind über die gesamte Membranfläche hinweg zumindest eng benachbart angeordnet, wahrscheinlich bilden sie aufgrund starker Wechselwirkung sogar regelrechte Netzwerke.

Abb. 2 Schematische, dreidimensionale Darstellung eines Membranquerschnitts. Die Verteilung der Proteine (schraffiert) ohne gegenseitige Wechselwirkung entspricht dem "fluid-mosaic-Modell" von SINGER und NICOLSON (79). Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind nur integrale Membranproteine dargestellt. Nach (79).

Abb. 3 Schematische, dreidimensionale Darstellung eines Membranquerschnitts analog zu Abb. 2. Die Anordnung der Proteine mit starker Wechselwirkung über weite Bereiche der Membran ("long-range order") entspricht dem von CAPALDI und GREEN (16) vorgeschlagenen Modell.

Durch Vernetzung mit Dicarbonsäurediimidoestern konnten ringsum kovalent geschlossene Hülsen isoliert werden, die in kochendem 1% SDS ihre Stäbchenform beibehielten und im wesentlichen aus den Proteinen I, II* und IV bestanden. Als ringsum vernetzbar erwiesen sich nur ganze Zellen und Hülsen, die nicht mit Trypsin behandelt worden waren. Trypsineinwirkung führte zum Verlust der Vernetzbarkeit durch Spaltung von Polypeptid II*. Bei Vernetzung trypsinisierter Hülsen entstanden oligomere, kovalent verknüpfte Komplexe, von denen zwei mit hoher Wahrscheinlichkeit als Dimere bzw. Trimere von Polypeptid I identifiziert werden konnten. Diese Komplexe traten auch bei der Vernetzung ganzer Zellen und nicht trypsinisierter Hülsen als Zwischenprodukte in Erscheinung. Mit Glutaraldehyd konnten auch trypsinisierte Hülsen ringsum quervernetzt werden.

Eine zweite Form SDS-resistenter, zellförmiger Proteinnetze war nach Oxydation von nicht trypsinisierten Hülsen mit $CuSO_4$-o-Phenanthrolin zu beobachten. Hierbei wurden offensichtlich etwa dreißig verschiedene Proteine der äußeren Membran über Disulfidbrükken miteinander verknüpft. Die Hülsenproteine I-IV zählen nicht zu diesen sogenannten "oxydierbaren Proteinen", die bei Trypsineinwirkung rasch verdaut werden und die für die Rundumvernetzung mit Diimidoestern nicht erforderlich sind. In Abschn. 4 wird ausführ-

lich diskutiert, inwieweit die erzielten Ergebnisse Rückschlüsse auf die Feinstruktur der äußeren Membran von E. coli erlauben.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Organismen, Medien und Wachstumsbedingungen

2.1.1 Bakterienstämme

Die verwendeten Bakterienstämme sind in Tab. 1 aufgeführt. Alle sind Abkömmlinge von E. coli K12. Der Minizellen-bildende Stamm P678-54, den Dr. U. Schwarz freundlicherweise zur Verfügung stellte, sowie die Mutante lss12 (abgeleitet vom Wildtyp W945T3282) fanden Verwendung ausschließlich bei den in den Abschn. 3.4 und 3.5 beschriebenen Versuchen. Alle übrigen Versuche wurden mit W945T3282 (im folgenden "3282" abgekürzt) durchgeführt.

2.1.2 Medien und Wachstumsbedingungen

Als Medium für Stamm 3282 diente Antibiotic Medium Nr. 3 (17,5 g/l), versetzt mit D,L-α, ε-Diaminopimelinsäure (Dap) (20 µg/ml) und Thymin (40 µg/ml). Zur Aufzucht von lss12 wurde diesem Medium Rohrzucker (Endkonzen-

Tab. 1: Bakterienstämme

Stamm	Genotyp[a)]	Herkunft
W945T3282	dap[b)] his leu lys thy lac str^R F^-	(36)
lss12	W945T3282 rod^{ts}	(36)
P678-54	leu thr gal lac mal mtl xyl F^-	(1)

a) Genort-Symbole: Auxotrophie für Diaminopimelinsäure (dap), Histidin (his), Leucin (leu), Lysin (lys), Threonin (thr), Thymin (thy); kein Wachstum auf Galactose (gal), Lactose (lac), Maltose (mal), Mannitol (mtl), Xylose (xyl) als einziger Kohlenstoffquelle; Verlust des Wachstums in Stäbchenform bei 42°C (rod^{ts}); Resistenz gegen Streptomycin (str^R).

b) Aufgrund einer defekten Diaminopimelat-Decarboxylase ist die Umwandlung von Diaminopimelinsäure (Dap) in Lysin blockiert. Bei Wachstum in Gegenwart von radioaktiver Dap findet sich die Markierung deshalb nur im Murein.

tration 12%[+)]) und 8 mM $MgSO_4$ zugegeben. P678-54 wurde auf Minimalcitrat nach VOGEL und BONNER (87) mit 0,2% Casamino Acids gezogen.

[+)] Soweit nicht besonders gekennzeichnet, handelt es sich bei allen Prozentangaben um Gewichtsprozent.

Die Aufzucht erfolgte unter starker Belüftung bei 30°C; nicht-permissive Wachstumstemperatur für lss12 war 42°C. Bei Belüftung in 750 ml- und 15 l-Flaschen wurden einige Tropfen bzw. 1,5 ml Silicon-Antischaumemulsion zugegeben. Die Zellen wurden in der späten logarithmischen Wachstumsphase durch Zentrifugation (10 Min., 12 000 x g) geerntet, sobald die Kulturflüssigkeit eine Extinktion von 0,8 (3282) bzw. 0,6 (lss12 und P678-54) erreicht hatte. Die Trübung wurde in einem Eppendorf-Photometer bei 578 nm Wellenlänge und 1 cm Schichtdicke gemessen.

Zur Markierung des Mureins wurde dem Vollmedium neben Thymin 5 µg/ml unmarkierte Dap sowie 0,5 µg/ml ^{3}H-markierte Dap (300 mCi/mMol) zugegeben. Die inkorporierte Radioaktivität wurde durch Scintillationszählung in einem Packard Tricarb Scintillations-Spektrometer (Packard Instrument Comp., La Grange, Ill., USA) gemessen.

Zur Markierung des Lipoproteins (Bande IV) wurde dem Vollmedium neben den üblichen Mengen Dap und Thymin 0,5 µg/ml 1-^{14}C-Palmitinsäure (59 mCi/mMol) zugegeben.

Um das Reduktionspotential in der Zellwand abzubauen, wurden Zellen nach BERGER (5) mit Dinitrophenol ausgehungert. Hierbei wurden die geernteten Zellen einmal mit Minimalcitrat (87) gewaschen, im selben Medium mit 5 mM Dinitrophenol suspendiert (100 mg Feucht-

gewicht pro ml) und 12 Std. lang unter starker Belüftung bei 30°C inkubiert.

2.2. Präparative Methoden

2.2.1 Zellhülsen

Die Präparation von Zellhülsen erfolgte nach der Methode II von HENNING et al. (37). Die geernteten Zellen wurden mit 0,85% NaCl gewaschen, in 20 mM Tris·HCl-Puffer pH 7,5, der 40% Rohrzucker und 1 Vol.-% Triton X-100 enthielt, suspendiert (100 mg Feuchtgewicht pro ml) und über Nacht gerührt. Dieser Puffer enthielt außerdem, wie alle im weiteren Verlauf der Präparation verwendeten Lösungen, 8 mM $MgSO_4$. Die Zellen wurden abzentrifugiert und im selben Volumen 4 M Harnstoff aufgenommen. Nach 2 Std. wurden sie einmal mit 20 mM Tris·HCl pH 9 gewaschen und im halben Volumen desselben Puffers suspendiert, dem 1 mg/ml Trypsin zugegeben wurde. Nach weiteren 2 Std. wurden die Zellen abzentrifugiert, mit 8 mM $MgSO_4$ gewaschen und im selben Volumen 50 mM Ammoniumacetat mit 65 mM NaCl und 200 µg/ml Lysozym resuspendiert. Die Hülsen wurden nach 4 Std. Lysozymeinwirkung abzentrifugiert (10 Min., 16 000 x g), je einmal mit 4 M Harnstoff und 8 mM $MgSO_4$ gewaschen und entweder weiter aufgearbeitet oder in 8 mM $MgSO_4$ mit 0,05% NaN_3 bei 4°C aufbewahrt.

Bei der Herstellung von "Hülsen ohne Trypsin" (siehe 3.1) wurden die ersten beiden Aufarbeitungsschritte (Rohrzucker/ Triton X-100 und Harnstoff) jeweils wiederholt. Wie die elektrophoretische Prüfung zeigte, konnten dadurch die zahlreichen schwachen Banden, die bei Trypsineinwirkung verschwinden, stark reduziert werden.

Zellhülsen, die nach Durchlaufen der gesamten Hülsenpräparation noch mit Pronase behandelt werden sollten, wurden mit 20 mM Tris·HCl pH 7,5 gewaschen, im selben Puffer suspendiert (50 mg/ml Feuchtgewicht) und nach Zugabe von Pronase (150 µg/ml) 6 Std. bei Raumtemperatur inkubiert. Vor der weiteren Aufarbeitung wurden sie einmal mit 8 mM $MgSO_4$ gewaschen.

2.2.2 Zellhüllen

Leere, aber weitgehend stäbchenförmige Zellhüllen wurden nach der von BRAUN et al. (11) beschriebenen Methode isoliert. Dabei werden frisch geerntete Zellen mit Glasperlen geschüttelt, die Glasperlen abfiltriert und die Zellhüllen durch mehrmals wiederholte differentielle Zentrifugation gereinigt.

2.2.3 Extraktion des Phospholipids

Das Phospholipid wurde aus lyophilisierten Zellen oder Zellhülsen mit Chloroform-Methanol extrahiert (47). Sollten ganze Zellen extrahiert werden, so wurden diese nach der Ernte einmal mit 0,85% NaCl gewaschen und aus wässriger Suspension lyophilisiert. Das Trockenmaterial wurde zweimal mit Chloroform-Methanol (2:1) gewaschen, abzentrifugiert und durch offene Lagerung bei Raumtemperatur über Nacht getrocknet. Suspendiert in wässrigem Medium erwiesen sich die Zellen und Hülsen als morphologisch unversehrt. Sie wurden vor der weiteren Aufarbeitung mehrmals mit dem entsprechenden Puffer gewaschen.

2.2.4 Trypsin-Behandlung ganzer Zellen

Die frisch geernteten Zellen wurden einmal mit 0,85% NaCl gewaschen, in 20 mM Tris·HCl pH 9 aufgenommen (10 mg Feuchtgewicht pro ml) und nach Zugabe von Trypsin (500 µg/ml) 10 Std. lang bei Raumtemperatur inkubiert.

2.2.5 Kinetik der Trypsineinwirkung

Nach den ersten beiden Schritten der Hülsenpräparation (Rohrzucker/Triton X-100

und Harnstoff) wurden die Hülsen einmal mit 20 mM Tris·HCl pH 9 gewaschen und im selben Puffer aufgenommen (100 mg Feuchtgewicht pro ml). 1 mg/ml Trypsin wurde zugegeben und die Suspension anschließend in mehrere Proben geteilt, bei denen die Verdauungsreaktion zu verschiedenen Zeiten (5 Min., 10 Min., 30 Min., 60 Min., 12 Std.) durch Zugabe von Trypsininhibitor (1 mg/ml) abgebrochen wurde. Nach erfolgter Vernetzung mit Diimidoestern bzw. Oxydation mit $CuSO_4$-o-Phenanthrolin wurde das Murein wie bei der Hülsenpräparation mit Lysozym abgebaut.

2.2.6 Trägergebundenes Trypsin

Bei der Behandlung von Hülsen mit trägergebundenem Trypsin fand ein handelsübliches Präparat Verwendung (Trypsin-30 Enzygel, Boehringer, Mannheim), das zuvor sechsmal mit 20 mM Tris·HCl pH 9 gewaschen worden war. Das Zellmaterial wurde im selben Puffer suspendiert (10 mg Feuchtgewicht pro ml) und nach Zugabe von trägergebundenem Trypsin (2 mg Trockengewicht pro ml) unter ständigem Rühren 10 Std. lang inkubiert. Da sich das schwere Gel anschließend schnell am Boden des Gefäßes absetzte, konnte es durch Dekantieren des Überstands leicht vom Substrat abgetrennt werden.

2.2.7 Isolierung von Minizellen, Aufschluß durch Ultraschall

Die aus 30 l Kulturflüssigkeit gewonnenen Zellen wurden in 300 ml 70 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 6,8 mit 5% Rohrzucker (Minizellpuffer) suspendiert und 10 Min. mit 4 000 x g zentrifugiert. Nach mikroskopischer Prüfung des Überstands, in dem sich fast ausschließlich Minizellen finden sollten, wurde das Sediment zur erneuten Zentrifugation in Minizellpuffer resuspendiert. Drei Zentrifugationsgänge bei 4 000 x g und drei weitere bei 3 000 x g folgten. Die bei verringerter Zentrifugation gewonnenen Überstände waren stärker durch stäbchenförmige Zellen verunreinigt, sie wurden deshalb einer erneuten Zentrifugation bei 3 000 x g unterworfen. In der durch Vereinigung aller Überstände gewonnenen Minizellsuspension betrug der Anteil stäbchenförmiger Zellen etwa 0,2%. Das Sediment wurde in Minizellpuffer suspendiert und 10 Min. mit 2 000 x g zentrifugiert. Das so gewonnene Sediment stäbchenförmiger Zellen war zwar nicht völlig frei von Minizellen, doch fallen diese aufgrund ihrer geringen Zellmasse (etwa 1/10 einer stäbchenförmigen Zelle (1)) nicht ins Gewicht.

Zum Aufschluß durch Ultraschall wurden Stäbchen- und Minizellen in 70 mM Kaliumphosphat pH 6,8 aufgenommen (15 mg/ml Protein). Je 10 ml wurden unter Eiskühlung mit einem Sonifier S75 (Branson Instruments, Stamford,

Conn., USA) 15 Min. lang auf Stufe 8 bei 11 Amp. beschallt, wobei jeweils nach 1 Min. kurz unterbrochen wurde, um eine Erwärmung der Proben zu vermeiden. Die Zellwandbruchstücke wurden abzentrifugiert (10 Min., 48 000 x g) und weiterbehandelt, wie für die Hülsenpräparation beschrieben.

2.2.8 Quervernetzung mit Diimidoestern

Alle Diimidoester wurden im wesentlichen nach der von DAVIES und STARK (21) beschriebenen Modifikation der Methode von McELVAIN und SCHROEDER (55) dargestellt.

Ganze Zellen (nach der Ernte mit 0,85% NaCl gewaschen) wurden einmal mit 1 M Triäthanolamin pH 8,5 gewaschen und im selben Puffer aufgenommen (100 mg Feuchtgewicht pro ml). Anschließend wurde dasselbe Volumen Diimidoester (bei Rundumvernetzung 200 mM), gelöst in 1 M Triäthanolamin pH 8,5, zugegeben. Der pH-Wert wurde überprüft und wenn nötig nachgestellt. Diese Suspension wurde 3 Std. bei Raumtemperatur gerührt. Sollte die Vernetzung bei niedrigerer Temperatur vorgenommen werden, so wurden Zellsuspension und Diimidoesterlösung im Eisbad vorgekühlt und nach Vereinigung 8 Std. unter gelegentlichem Umschütteln bei 4°C im Kühlschrank oder bei -10° in einem gekühlten Methanolbad gehalten.

Nach Vernetzung wurden die Zellen abzentrifugiert (10 Min., 12 000 x g) und der Hülsenpräparation unterworfen.

Die Vernetzung von Hülsen und Zellwandbruchstücken erfolgte in gleicher Weise, allerdings wurde hier an Zellmaterial nur jeweils die Hälfte (50 mg Feuchtgewicht pro ml) eingesetzt. Trypsinisierte Hülsen sowie die aus Stäbchen- und Minizellen des Stammes P678-54 isolierten Zellwandbruchstücke wurden nach durchlaufener Hülsenpräparation vernetzt, "Hülsen ohne Trypsin" in der Regel nach dem Harnstoffschritt. Hier wurde das Murein nach der Vernetzung wie bei der Hülsenpräparation abgebaut.

In jedem Fall wurde das Zellmaterial nach Vernetzung bzw. nach den sich anschliessenden Schritten der Hülsenpräparation abzentrifugiert, in 1% SDS (Probenpuffer, siehe 2.3.2) suspendiert und 5 Min. lang gekocht. Nach Zentrifugation (10 Min., 48 000 x g) wurde der Überstand elektrophoretisch geprüft, wenn die Vorgänge bei der Teilvernetzung Gegenstand der Untersuchung waren. Bei Rundumvernetzung wurde das sedimentierte Material nochmals mit kochendem 1% SDS extrahiert, zweimal mit 90 Vol.-% Aceton gewaschen (91) und aus wässriger Suspension lyophilisiert.

2.2.9 Quervernetzung mit Glutaraldehyd

Die Vernetzung mit Glutaraldehyd wurde nach STECK (80) vorgenommen. Zellhülsen wurden mit 5 mM Natriumphosphat pH 8 gewaschen und im selben Puffer aufgenommen (2 mg/ml Protein). Zur Hülsensuspension wurde dasselbe Volumen Glutaraldehyd, entsprechend verdünnt mit 5 mM Natriumphosphat pH 8, zugegeben. Die Vernetzung erfolgte 6 Std. bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert (10 Min., 17 000 x g), in 10 mM Natriumphosphat pH 6,9 mit 1% SDS suspendiert und 5 Min. lang in kochendem Wasserbad erhitzt. Unlösliches wurde abzentrifugiert (10 Min., 12 000 x g) und der Überstand unmittelbar für die SDS-Gelelektrophorese verwendet.

2.2.10 "Oxydationshülsen"

Bei der Herstellung von "Hülsen ohne Trypsin", die oxydiert werden sollten, wurden die ersten beiden Schritte der Hülsenpräparation nur einfach ausgeführt, um die in geringer Menge vorliegenden Hülsenproteine nicht übermäßig zu reduzieren. Das zu oxydierende Material wurde mit 70 mM Tris·HCl pH 8,7 gewaschen und im selben Puffer aufgenommen (10 mg Feuchtgewicht pro ml). $CuSO_4$ und o-Phenanthrolin wurden

in Endkonzentrationen von 0,072 mM und 0,2 mM zugegeben (49). Diese Suspension wurde dann 3 Std. lang bei Raumtemperatur belüftet, das Zellmaterial abzentrifugiert (10 Min., 17 000 x g) und viermal mit Wasser gewaschen.

Obwohl eine Oxydation mit gleichem Erfolg auch nach Abbau des Mureins möglich ist, wurden in der Regel "Hülsen ohne Trypsin" oxydiert, die das Murein intakt enthielten. Diese wurden dann in 25 mM Ammoniumacetat mit 50 µg/ml Lysozym suspendiert (5 mg Feuchtgewicht pro ml), nach 1 Std. abzentrifugiert (10 Min., 17 000 x g) und in 2% SDS 5 Min. lang gekocht. Die so gewonnenen "Oxydationshülsen" wurden abzentrifugiert (6 Std., 100 000 x g) und nochmals mit heißem SDS extrahiert. Sie wurden anschließend mit 90 Vol.-% Aceton gefällt (91) und dreimal gewaschen, in Wasser aufgenommen und lyophilisiert.

Chloroform-Methanol-extrahierte Zellen wurden nach der Oxydation in 25 mM Ammoniumacetat mit 30% Rohrzucker und 1 Vol.-% Triton X-100 aufgenommen. Nach Zugabe von 150 µg/ml Lysozym wurde diese Suspension 4 Std. bei Raumtemperatur gehalten. SDS-Extraktion und weitere Behandlung erfolgten wie oben beschrieben.

Oxydierte Zellhüllen wurden genau wie "Hülsen ohne Trypsin" mit Lysozym behandelt und anschließend in 2% SDS erhitzt, um zu

überprüfen, ob die Oxydation zu SDS-Resistenz geführt hatte.

2.2.11 Jodacetamid-Behandlung

"Hülsen ohne Trypsin" wurden einmal mit 4 M Harnstoff-Lösung pH 8,2 gewaschen, die 0,1 M Mercaptoäthanol enthielt, und ein weiteres Mal mit 4 M Harnstoff, um das restliche Mercaptoäthanol zu entfernen. Anschliessend wurde das Zellmaterial in 4 M Harnstoff suspendiert, dem 50 mM Jodacetamid zugegeben worden war (pH 8,2 mit Trimethylamin nachgestellt). Nach 2 Std. wurden die Hülsen abzentrifugiert und mit $CuSO_4$-o-Phenanthrolin wie in 2.2.10 beschrieben oxydiert.

2.3 Analytische Methoden

2.3.1 Ammonolyse

Etwa 100 mg lyophilisiertes Material wurden in 20 ml einer Mischung aus 15 Teilen konzentriertem NH_4OH (33% NH_3) und 1 Teil Eisessig gegeben. Diese Suspension wurde 15 Min. lang bei Raumtemperatur gerührt. Längere Inkubation führte nicht zu höherer Ausbeute an freigesetzten Polypeptidketten, sondern viel-

mehr zu verstärkter Fragmentierung vor allem von Protein II. Nach Zentrifugation (10 Min., 37 000 x g) wurde der Überstand lyophilisiert, das Sediment in 1% SDS suspendiert und 5 Min. gekocht. Der Überstand nach erneuter Zentrifugation wurde lyophilisiert, zweimal mit 90% Aceton gewaschen (91), um das Detergens zu entfernen, und wiederum lyophilisiert. Die beiden Lyophilisate wurden entweder vereinigt oder getrennt durch SDS-Gelelektrophorese näher charakterisiert.

2.3.2 SDS-Gelelektrophorese

Die SDS-Gelelektrophorese wurde nach HENNING et al. (37) durchgeführt. Die Proben wurden in 10 mM Natriumphosphat-Puffer pH 6,9 gelöst, der 1% SDS und 100 mM Mercaptoäthanol enthielt, sowie, um gleichmäßiges Auftragen der Proben zu erleichtern und die Front sichtbar zu machen, 5 Vol.-% Glycerin und 0,0025% Bromphenolblau ("Probenpuffer"). Die gelösten Proben wurden 5 Min. lang in kochendem Wasserbad erhitzt. Zur Herstellung der Gele wurden 28,5 ml 50 mM Natriumphosphat pH 7 mit 10% Acrylamid, 0,133% N,N'-Methylenbisacrylamid, 0,2% SDS und 0,009% N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin unter Kühlung entlüftet. Um rasche und gleichmäßige Polymerisation zu erzielen, wurden 1,5 ml Ammoniumperoxodisulfat-

Lösung (15 mg/ml) zugegeben. Das Gemisch wurde in 6 cm lange Glasröhrchen mit 5 mm Innendurchmesser gefüllt und vorsichtig mit Wasser überschichtet. Als Elektrophoresepuffer fand 20 mM Natriumphosphat pH 7 mit 0,08% SDS Verwendung. Die Stromstärke betrug 3 mA pro Röhrchen, bis die Probe völlig ins Gel eingezogen war, anschließend 6 mA. Die Gele wurden nach WEBER und OSBORN (89) 1 Std. lang mit Coomassie Brilliant Blue angefärbt (45 Vol.-% Methanol, 9,2 Vol.-% Eisessig, 2,5% Coomassie Brilliant Blue). Die Entfärbung erfolgte elektrophoretisch in einem Canalco "Quick Gel Destainer" (Canalco, Rockville, Md., USA), die Entfärbelösung enthielt 7,5 Vol.-% Eisessig und 5 Vol.-% Methanol.

2.3.3 Molekulargewichtsbestimmung

Für die Elektrophorese-Gele zur Molekulargewichtsbestimmung wurden Acrylamidkonzentrationen zwischen 4% und 8% gewählt. Dabei wurden gegenüber der oben erwähnten Zusammensetzung 10%iger Gele lediglich die Anteile an Acrylamid und Methylenbisacrylamid gleichermaßen verringert. Die Markierung der Front erfolgte mit Pyronin Y. Vor Anfärbung mit Coomassie Brilliant Blue wurden die Gele am vorderen Rand der Pyroninzone abgeschnitten. Die Lage der Banden wurde mikrodensitometrisch vermessen.

Als Standard diente ein Gemisch aus vernetztem Ovalbumin, das neben unvernetztem Monomeren kovalent verknüpfte Oligomere bis zum Hexameren in ausreichender Menge enthielt. Die Vernetzung erfolgte unter den von CARPENTER und HARRINGTON (17) vorgeschlagenen Bedingungen. 5 mg Ovalbumin wurden in 1 ml 200 mM Triäthanolamin pH 8,5 gelöst. Sofort nach Zugabe von 1 ml desselben Puffers, der 6 mg Korksäurediimidodimethylester sowie 2% SDS und 2% Mercaptoäthanol enthielt, wurde das Gemisch in einem auf -40°C gekühlten Methanolbad eingefroren und 16 Std. bei -14°C aufbewahrt. Die Probe wurde dann aufgetaut, 5 Min. in kochendem Wasserbad erhitzt und zentrifugiert (90 Min., 100 000 x g). Der Überstand wurde nach Zugabe von Glycerin (5 Vol.-%) und Pyronin Y unmittelbar zur Elektrophorese verwendet.

2.3.4 Weitere analytische Methoden

Der Proteingehalt von Hülsensuspensionen wurde nach der modifizierten Biuret-Methode von BEISENHERZ et al. (3) bestimmt. Die Proben wurden in 5 ml 1% SDS 5 Min. lang gekocht, nach Erkalten wurden 5 ml Biuret-Lösung zugegeben. Der sich bildende violette Kupfer-Komplex wurde nach 30 Min. photometrisch gemessen (Eppendorf-Photometer, 546 nm Wellenlänge).

Die Bestimmung des Proteinanteils vernetzter oder oxydierter Hülsen erfolgte durch Aminosäureanalyse mit einem Multichrom B Analyser (Beckman Instruments, München). Die Proben wurden mit 6 N Salzsäure (24 Std., 110°C) hydrolysiert und zur Trockene eingedampft. War die absolute Menge der enthaltenen Dap von Interesse, so wurden die Proben zuvor mit Perameisensäure nach HIRS (41) oxydiert; die Umwandlung von Methionin zu Methioninsulfon ermöglicht eine getrennte Messung von Dap und Methionin, die sonst gleichzeitig eluiert werden. 40 mg lyophilisierter Probensubstanz wurden in 2 ml gekühlter Ameisensäure gelöst. Nach Zugabe von 4 ml einer vorgekühlten Mischung aus 95 Vol.-% Ameisensäure und 5 Vol.-% Wasserstoffperoxyd wurde das Gemisch 2 Std. im Eisbad gekühlt, mit Wasser verdünnt und lyophilisiert.

Zur Bestimmung des Lipopolysaccharidgehalts von Hülsen wurde das Ketodesoxyoctonat nach OSBORN (60) gemessen. Dieses macht bei E. coli etwa 7% des gesamten Lipopolysaccharids aus (35).

Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden mit einem Philips EM 201 Mikroskop durchgeführt. Im einzelnen wurde dabei nach konventionellen und bei HENNING et al. (34) aufgeführten Methoden verfahren.

Die mikrodensitometrische Vermessung von Elektrophorese-Gelen erfolgte mit einem

Mikrodensitometer MK IIIB von Joyce, Loebl + Co. (Gateshead-on-Tyne, England). Zur Bestimmung der Farbintensität einzelner Banden wurden die entsprechenden Peaks ausgeschnitten und gewogen (88) oder ihre Fläche planimetrisch gemessen. Die mit beiden Methoden erzielten Ergebnisse stimmten gut überein, die Meßfehler lagen in jedem Fall innerhalb der bei mikrodensitometrischen Messungen zu erwartenden Fehlergrenze (Schwankungen zwischen Gelen verschiedener Elektrophoresen, Hintergrundfärbung usw.).

Elektrophorese-Gele, die radioaktiv markiertes Material enthielten, wurden zur Autoradiographie längs halbiert und unter vermindertem Druck auf Filterpapier getrocknet. Mit diesem wurde Röntgenfilm Osray T4 (Agfa Gevaert) belichtet; je nach Strahlungsintensität betrug die Belichtungszeit eine bis drei Wochen.

2.4 Chemikalien

Die Chemikalien wurden von folgenden Herstellern und Lieferanten bezogen: Antibiotic Medium Nr. 3 (Penassay) und Casamino Acids von Difco Laboratories (Detroit, Mich., USA); 1-^{14}C-Palmitinsäure von NEN Chemicals GmbH (Dreieichenhain bei Frankfurt/M.); ^{3}H-Diaminopimelinsäure und ^{14}C-

markierte Aminosäuren von The Radiochemical Centre Amersham (Amersham, England); Lysozym (aus Hühnereiweiß), Trypsin-Inhibitor und Tris(hydroxymethyl)-aminomethan von Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim); Dithiothreitol (Cleland's Reagens) von Calbiochem AG (Luzern, Schweiz); Acrylamid (zur Molekulargewichtsbestimmung "Electrophoresis Grade") von Eastman Kodak Comp. (Rochester, N.Y., USA); 2-Mercaptoäthanol, N,N'-Methylenbisacrylamid und Triäthanolamin von Fluka AG (Buchs, Schweiz); Pyronin Y von K+K Laboratories (Hollywood, Calif., USA); Silicon-Antischaumemulsion von Roth (Karlsruhe); Glutaraldehyd und sämtliche Dinitrile zur Synthese der Diimidoester von Schuchardt (München); Coomassie Brilliant Blue und Rohrzucker (Special Enzyme Grade Sucrose) von Schwarz-Mann (Orangeburg, N.Y., USA); Albumin aus Hühnerei (reinst), Dinitrophenol, Jodacetamid, Pronase P, N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin und Triton X-100 von Serva (Heidelberg); D,L-α, ε-Diaminopimelinsäure von Sigma Chemical Comp. (St. Louis, Mo., USA). Alle übrigen Chemikalien wurden von Merck AG (Darmstadt) bezogen.

3. ERGEBNISSE

3.1 Zwei Klassen von Proteinen in "Hülsen ohne Trypsin"

Die Präparation von Zellhülsen umfaßt vier Schritte: 1.) Zerstörung der von der Cytoplasmamembran gebildeten Permeabilitätsbarriere mit 1% Triton X-100 in 40% Rohrzucker (7,75), 2.) Waschen mit 4 M Harnstoff, 3.) Einwirkung von Trypsin, 4.) Abbau des Mureins mit Lysozym.

Trypsin zeigt dabei verschiedene Wirkungen: Zum einen wird eine Vielzahl von Proteinen verdaut, die in der SDS-Gelelektrophorese als zahlreiche schwächere Banden in Erscheinung treten (vorwiegend mit geringerer Beweglichkeit als Bande I); zum anderen wird von Polypeptid II* ein Teil abgespalten, der Rest wandert in der Elektrophorese als Bande II. In den Abschnitten 3.2 und 3.3 wird gezeigt, daß sich auch die Vernetzbarkeit mit Diimidoestern ändert. Werden Hülsen nach dem Harnstoff-Schritt mit Diimidoestern quervernetzt und anschließend ohne Trypsineinwirkung der Lysozym-Verdauung unterworfen, so behalten die Endprodukte auch in kochendem 1% SDS die ursprüngliche Zellform bei. Nach dem Trypsin-Schritt können zwar noch einzelne Polypeptide zu Oligomeren vernetzt werden, die Hülsen lösen sich aber in 1% SDS auf.

Es galt zu klären, ob der Verlust der Vernetzbarkeit mit der Spaltung von II* oder

mit dem Abbau der zahlreichen in geringer Menge vorliegenden Proteine zusammenhängt, oder ob beide Effekte eine Rolle spielen. Aufschluß hierüber gab eine Untersuchung der Kinetik beider Trypsin-Effekte. Aus den in Abb. 4 gezeigten Gelen ist zu ersehen, daß eine Trypsineinwirkung von 30 Min. auf Hülsen genügte, um alle Banden außer den vier Hauptbanden weitgehend zu reduzieren, ohne zu einer Spaltung von II* zu führen. Zu diesem Zeitpunkt konnten die Hülsen mit Diimidoestern noch rundum quervernetzt werden. Sie verloren die Vernetzbarkeit erst nach einer Stunde Trypsineinwirkung, als in den Elektrophorese-Gelen die Bande II aufzutauchen begann. Die Vernetzung mit Diimidoestern zu SDS-resistenten Hülsen kann also unabhängig von den vielen Proteinen geschehen, die durch Trypsin rasch verdaut werden; sie ist aber nur solange möglich, als II* etwa im üblichen stöchiometrischen Verhältnis vorliegt.

Die klare Unterteilung der vor Trypsineinwirkung vorhandenen Hülsenproteine in zwei Klassen, nämlich in solche, die von Trypsin rasch verdaut und für die Rundumvernetzung mit Diimidoestern nicht benötigt werden, und solche, die von Trypsin nicht oder nur teilweise abgebaut werden und von denen zumindest II* für die Vernetzbarkeit essentiell zu sein scheint, wurde durch einen glücklichen Umstand bestätigt: In Abschnitt 3.7 wird gezeigt, daß

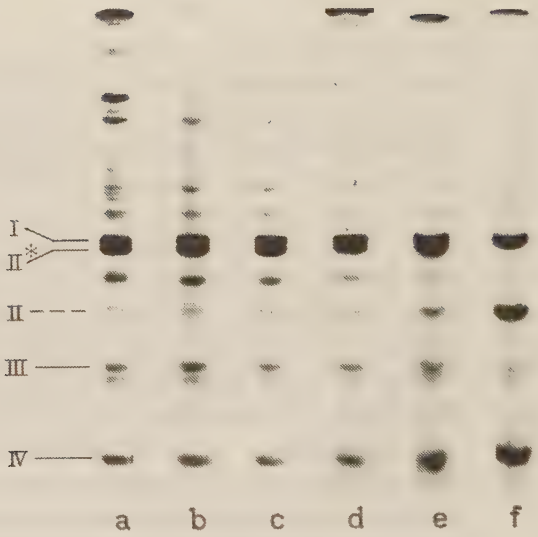


Abb. 4 Kinetik der Trypsin-Einwirkung auf die Hülsenproteine (siehe 2.2.5).

Hülsen wurden nach dem Harnstoff-Schritt der Hülsenpräparation 5 Min. (b), 10 Min. (c), 30 Min. (d), 60 Min. (e) bzw. 12 Std. (f) lang mit Trypsin behandelt. Die Trypsineinwirkung wurde durch Zugabe von Trypsininhibitor beendet. Die Kontrollprobe (a) wurde nicht mit Trypsin behandelt. Anschliessend wurde das Murein entsprechend der Hülsenpräparation mit Lysozym abgebaut. Die Auftrennung der Proteine erfolgte durch SDS-Gelelektrophorese. Nur die der Probe (a) entsprechenden Hülsen konnten mit $CuSO_4$-o-Phenanthrolin oxydiert werden. Eine Rundumvernetzung

gerade die Trypsin-empfindlichen Proteine mit Hilfe von oxydierenden Agentien über Disulfidbrücken verknüpft werden können. Wie bei der Vernetzung von Hülsen mit Diimidoestern entsteht auf diese Weise ein ringsum kovalent geschlossenes Proteinnetzwerk, das auch in kochendem 1% SDS die Zellform beibehält. Die darin enthaltenen Proteine werden zur Unterscheidung von den vier Hauptproteinen im folgenden "oxydierbare Proteine" genannt. Schon nach fünfminütiger Trypsinbehandlung ist eine Verknüpfung der "oxydierbaren Proteine" nicht mehr möglich.

---

mit Diimidoestern war bei den Proben (a)-(d) und mit verminderter Ausbeute bei Probe (e) möglich.

Das bei den Gelen (a)-(d) in Position der Bande II auftretende anfärbbare Material rührt sicherlich nicht von der Trypsineinwirkung her. Zum einen fehlte bei vorbereitenden Versuchen diese schwache Bande bei den entsprechenden Zeitwerten, zum anderen kam ja das Material der Probe (a) niemals mit Trypsin in Berührung. Möglicherweise wurde im Zug der Aufarbeitung ein kleiner Teil von II* fragmentiert (siehe auch Kontrollversuche zur Ammonolyse, 3.2.3).

Auch ohne Trypsineinwirkung ließ sich der Anteil der "oxydierbaren Proteine" in Hülsen stark verringern, wenn die ersten beiden Schritte der Hülsenpräparation jeweils wiederholt wurden. Die so gewonnenen Zellhülsen unterschieden sich von trypsinisierten neben der "Verunreinigung" durch "oxydierbare Proteine" vor allem dadurch, daß sie noch II* enthielten und im Phasenkontrastmikroskop dunkler erschienen. Sie werden im folgenden der Einfachheit halber "Hülsen ohne Trypsin" genannt, da die Präparation von Zellhülsen unter Umgehung des Trypsin-Schritts in den weiteren Abschnitten eine große Rolle spielt.

3.2 Rundumvernetzung mit Diimidoestern

3.2.1 Die Vernetzungsreaktion

Die kovalente Verknüpfung von Proteinen mit bifunktionellen Reagentien hat in jüngster Zeit große Bedeutung erlangt. Diese Methode gab Hinweise auf die Feinstruktur von Ribosomen (6,18,53), Enzymkomplexen (17,19, 33,50) und verschiedenen Membranen, vor allem der Erythrocytenmembran (27,28,42,80). Mehr und mehr finden hierbei Diimidoester Verwendung, da sie sich gegenüber Dialdehyden wie Glutaraldehyd durch drei Vorzüge auszeichnen:

Sie können je nach Kettenlänge nur eine bestimmte maximale Entfernung überspannen (Glutaraldehyd bildet durch Aldolkondensation Polymere) und sie reagieren nur mit Aminogruppen (43). Die Quervernetzung von Polypeptidketten kann also nur über die N-terminalen Aminogruppen oder über Lysin-Seitenketten erfolgen. Außerdem ist die Vernetzung nicht irreversibel. Die einzelnen Polypeptidketten lassen sich durch Ammonolyse aus den Oligomeren teilweise wieder in Freiheit setzen, ohne eine Veränderung zu erfahren. Der Reaktionsablauf bei Vernetzung und Ammonolyse ist in Abb. 5 dargestellt.

3.2.2 Rundumvernetzung von intakten Zellen und "Hülsen ohne Trypsin"

Ganze Zellen wurden mit Korksäurediimidodimethylester behandelt und der Hülsenpräparation unterworfen. Die so gewonnenen Zellhülsen unterschieden sich morphologisch nicht von normalen Hülsen, lediglich im Phasenkontrastmikroskop erschienen sie etwas dunkler. Während sich normale Hülsen schon bei Raumtemperatur in ionischen Detergentien, wie z.B. SDS, auflösen, behielten die vernetzten Hülsen selbst in kochendem 1% SDS die ursprüngliche Zellform bei (Abb. 6).

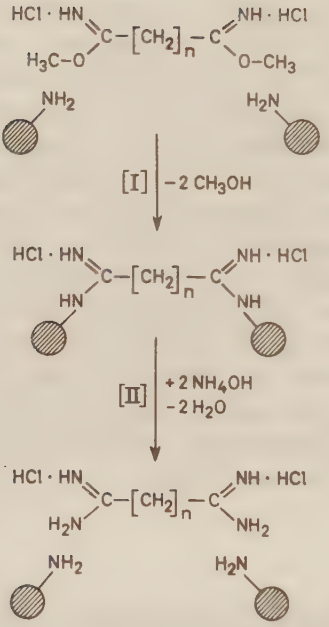


Abb. 5 Reaktionsablauf bei intermolekularer Vernetzung von zwei Polypeptidketten mit Diimidoestern [I] und Ammonolyse des Vernetzungsprodukts [II] . Zwischenstufen sind nicht berücksichtigt. Nach (43).

SDS-Resistenz nach Quervernetzung war auch bei "Hülsen ohne Trypsin" zu beobachten; hierbei wurden die Hülsen in der Regel nach dem Harnstoff-Schritt vernetzt und erst anschließend ohne Trypsineinwirkung mit Lysozym behandelt, um auszuschließen, daß Lysozym-Moleküle in die Quervernetzung einbezogen wurden. Trypsinisierte Hülsen dagegen konnten nicht rundum vernetzt werden. Wie in den Abschnitten 3.1 und 3.3 gezeigt, besteht offensichtlich ein Zusammenhang zwischen dem Verlust der Vernetzbarkeit und der Spaltung von II* durch Trypsin.

Die durch Quervernetzung von ganzen Zellen und "Hülsen ohne Trypsin" gewonnenen Hülsen erschienen im Phasenkontrastmikroskop nach Extraktion mit kochendem 1% SDS äußerst dünn und durchsichtig. Sie enthielten nur Spuren von Murein, wie Aminosäureanalyse und Markierung des Mureins mit ^{3}H-Dap zeigte. In beiden Fällen betrug die Ausbeute an intakten Hülsen 70-80% (Zählkammer).

Sowohl ganze Zellen wie auch "Hülsen ohne Trypsin" konnten neben Korksäurediimidodimethylester auch mit den Diimidodimethylestern der Malon-, Bernstein-, Adipin- und Sebacinsäure rundum quervernetzt werden. Die hierbei erzielten Ausbeuten wurden durch Vergleich mit einem Korksäure-vernetzten Präparat abgeschätzt; wesentliche Unterschiede waren nicht zu erkennen.

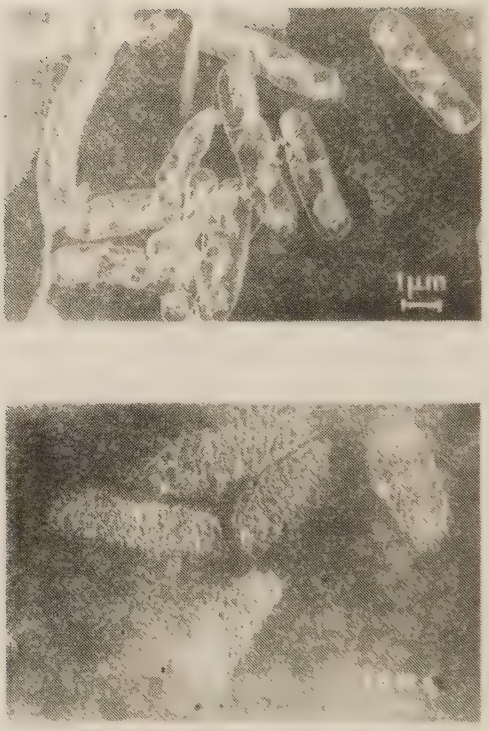


Abb. 6 Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Zellhülsen nach Bedampfung.

Oben: Normale Hülsen. Diese lösen sich in 1% SDS vollständig auf und ergeben bei SDS-Gelelektrophorese das in Abb. 7a wiedergegebene Bandenmuster. Aufnahme entnommen aus (37).

Unten: Rundum vernetzte, in 1% SDS gekochte Hülsen, gewonnen aus Zellen,

3.2.3 Zusammensetzung von rundum vernetzten Hülsen

Alle Daten über die Zusammensetzung von rundum vernetzten Hülsen beruhen auf Untersuchungen von Material, das mit Korksäurediimidodimethylester quervernetzt worden war. Signifikante Unterschiede zwischen verschiedenen Präparationen waren nicht festzustellen. Die ermittelten Werte glichen sich auch unabhängig davon, ob ganze Zellen oder "Hülsen ohne Trypsin" quervernetzt worden waren. Nach Extraktion mit kochendem 1% SDS war in den Hülsen meist kein Lipopolysaccharid mehr nachweisbar. Einige Präparationen enthielten noch etwa 5% (vom Trockengewicht), während normale Zellhülsen zu 30-40% aus Lipopolysaccharid bestehen. Durch saure Hydrolyse der SDS-extrahierten Hülsen und anschließende Aminosäureanalyse wurde der Proteinanteil bestimmt; er betrug 60-70%.

---

die mit Korksäurediimidodimethylester behandelt worden waren. Vor SDS-Extraktion glichen die vernetzten Hülsen morphologisch völlig den oben dargestellten, unvernetzten Zellhülsen.

MARINETTI et al. (54) berichten, daß bei der Vernetzung von Erythrocyten-"Ghosts" mit Difluordinitrobenzol oder Korksäurediimidodimethylester die Aminogruppen des Phospholipids vollständig umgesetzt werden und daß ein Teil des Phospholipids kovalent an Protein gebunden wird. Im vorliegenden Fall konnte nicht direkt gemessen werden, ob in den vernetzten Zellhülsen nach Kochen in SDS noch Phospholipid enthalten war, da alle leicht nachweisbaren Bestandteile des Phospholipids, wie Phosphat, Glycerin und Fettsäuren, zugleich auch Bestandteile des Lipoproteins (32) oder Lipopolysaccharids (15) sind.

Ein Ausweg bot sich aufgrund der Beobachtung, daß Zellhülsen auch nach Extraktion des gesamten Phospholipids mit Chloroform-Methanol ihre Form noch beibehalten (35). Eine Abschätzung des Phospholipidgehalts vernetzter Hülsen sollte unter der Voraussetzung möglich sein, daß auch diese Phospholipid-freien Hülsen rundum quervernetzt werden können und sich als formstabil in 1% SDS erweisen. Dies war tatsächlich der Fall. "Hülsen ohne Trypsin", die mit Chloroform-Methanol extrahiert, anschliessend mit Korksäurediimidodimethylester quervernetzt und nach Abbau des Mureins durch Lysozym in 1% SDS gekocht worden waren, bestanden zu 80-90% aus Protein. Ohne vorherige Chloroform-Methanol-Extraktion ent-

halten vernetzte Hülsen also etwa 20% Phospholipid, das sich mit kochendem 1% SDS nicht entfernen läßt und offenbar kovalent gebunden ist.

Zur Bestimmung der Gewichtsanteile der einzelnen Komponenten waren die vernetzten, SDS-extrahierten Hülsen lyophilisiert worden. Dieses Material enthielt aber noch 5-10% Wasser; nach Trocknung bei 60°C unter vermindertem Druck war ein entsprechender Gewichtsverlust festzustellen. Da das nicht unerheblich hygroskopische Verhalten ein genaues Auswiegen unmöglich machte, stellen diese Angaben zum Wassergehalt Mindestwerte dar.

Addiert man die Gewichtsanteile von Protein und Wasser, so wird deutlich, daß weitere mögliche Bestandteile der vernetzten Hülsen nur in sehr geringer Menge vorliegen und schon aufgrund stöchiometrischer Überlegungen eine formbestimmende Funktion eigentlich nicht erfüllen können. Dies umso mehr, als der Lipidanteil des Lipoproteins sowie andere mögliche Substituenten der Hülsenproteine mit Nicht-Protein-Charakter bei der Aminosäureanalyse nicht zu Buch schlagen. Bedenkt man ferner, daß normale Hülsen von vornherein neben Protein, Lipopolysaccharid und Phospholipid keine weiteren Hauptbestandteile enthalten, so scheint die Behauptung gesichert, daß rundum quervernetzte und mit SDS extrahierte Hülsen, wie die in Abb. 6b

gezeigten, fast ausschließlich aus Protein bestehen.

Diese Behauptung stimmt überein mit folgender Beobachtung: Normale Hülsen sind resistent gegenüber allen geprüften Proteasen (35,37). Diese Eigenschaft blieb bei Vernetzung mit Diimidoestern erhalten. Nach Extraktion mit kochendem 1% SDS lösten sich die vernetzten Hülsen innerhalb weniger Minuten auf, sobald Trypsin zugegeben wurde.

Durch Ammonolyse der vernetzten Hülsen nach SDS-Extraktion wurde versucht, zu klären, welche Polypeptide bei der Rundumvernetzung über Diimidoester miteinander verknüpft worden waren. Während der Behandlung mit Ammoniak-Essigsäure ging ein Teil des Ausgangsmaterials in Lösung, ein weiterer Teil konnte anschließend mit kochendem 1% SDS extrahiert werden. Diese beiden löslichen Fraktionen - insgesamt etwa ein Zehntel des eingesetzten Trockengewichts - wurden dann elektrophoretisch untersucht. Es kann nicht ausgeschlossen werden, daß aufgrund der geringen Ausbeute und der starken Hintergrundfärbung der Gele solche Polypeptide nicht erkannt wurden, die nur in geringer Menge in den vernetzten Hülsen enthalten waren. Trotzdem ließ das Bandenmuster der SDS-Gelelektrophoresen (Abb. 7b und c) zunächst darauf schließen, daß in den Hülsen, die aus rundum quervernetzten ganzen Zellen gewonnen wurden, im wesentlichen nur die vier

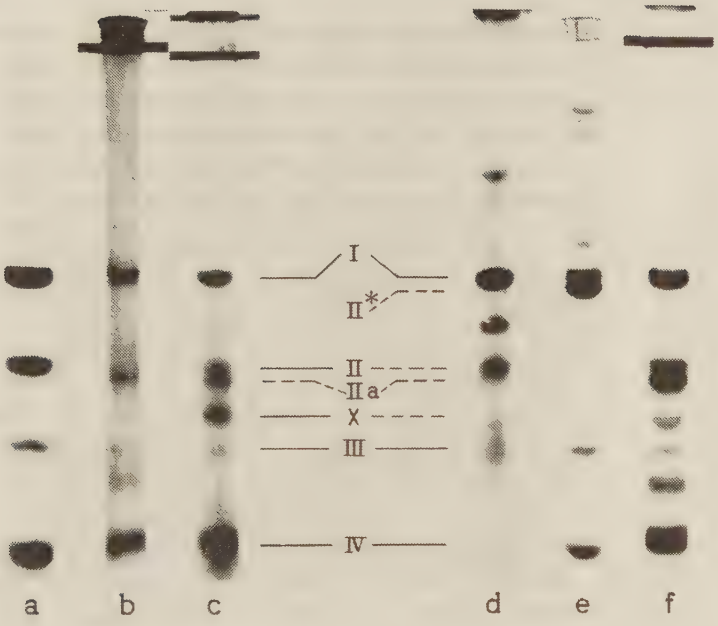


Abb. 7 Ammonolyse rundum quervernetzter ganzer Zellen (siehe 2.3.1).

SDS-Gelelektrophorese: a) normale Hülsen; b) Ammoniak-lösliche und c) SDS-lösliche Fraktion nach Ammonolyse von "Hülsen ohne Trypsin", die aus rundum vernetzten ganzen Zellen isoliert worden waren; d) unvernetzte "Hülsen ohne Trypsin" nach Ammonolyse; e) dasselbe Material vor Ammonolyse; f) normale Hülsen, die mehrere Tage lang in wässriger Suspension aufbewahrt worden waren.
Zur Herkunft von Bande X siehe Text.

Hauptproteine enthalten waren. Dies schien auch für die vernetzten "Hülsen ohne Trypsin" zu gelten. Hier wurden nach der Ammonolyse die beiden löslichen Fraktionen vereinigt; das Bandenmuster der SDS-Gelelektrophorese entsprach weitgehend Abb. 7b.

Wenn auch die Vorstellung sehr überzeugend erschien, daß in rundum vernetzten Hülsen im wesentlichen die vier Hauptproteine enthalten sind, so waren doch Widersprüchlichkeiten nicht zu übersehen: 1.) Im Gel Abb. 7c (Elektrophorese der SDS-löslichen Fraktion) tauchte eine neue Bande X zwischen den Banden II/IIa[+)] und III auf. 2.) Aus vernetzten "Hülsen ohne Trypsin" wurde durch Ammonolyse ein Polypeptid freigesetzt, das in seiner elektrophoretischen Beweglichkeit der Bande II entsprach. Anstelle der zu erwartenden Doppelbande I/II* war nur eine einzelne Bande zu erkennen, wahrscheinlich Bande I. 3.) Bei den in Abschnitt 3.3.3 beschriebenen Versuchen wurden "Hülsen ohne Trypsin" mit geringeren Konzentrationen von Diimidoestern vernetzt. Dabei zeigte sich eindeutig, daß Polypeptid III nicht quervernetzt wird.

+) Bande IIa fehlt bei manchen Hülsenpräparationen ganz, bei anderen tritt sie verschieden stark in Erscheinung; sie enthält wahrscheinlich ebenfalls ein tryptisches Fragment von II* (35, 37).

Um diese Widersprüche auszuräumen, bietet sich eine Erklärung an: Während der Ammonolyse könnte eine Fragmentierung von Polypeptidketten, darunter II*, an besonders empfindlichen oder exponierten Peptidbindungen erfolgen. Die zur Kontrolle vorgenommene Ammonolyse unvernetzter "Hülsen ohne Trypsin" zeigte, daß dies tatsächlich der Fall ist. Gegenüber der Elektrophorese des Ausgangsmaterials (Abb. 7e) traten neue Banden zwischen I und II sowie in Position II auf (Abb. 7d). Im Bereich I/II* war nur noch eine einzelne Bande zu erkennen. Außerdem erschien neues Material im Bereich der Bande III; eine eindeutige Unterscheidung war hier allerdings aufgrund der bereits vorhandenen Bande nicht möglich.

Unter Berücksichtigung der in Abschnitt 3.3.3 beschriebenen Versuche erscheint also folgende Aussage möglich: Hauptbestandteile der SDS-resistenten Hülsen, die durch Rundumvernetzung von ganzen Zellen oder "Hülsen ohne Trypsin" gewonnen wurden, sind im wesentlichen die Hülsenproteine I, II* und IV. Die Herkunft des Materials von Bande X konnte nicht eindeutig geklärt werden. Entweder rührt es von einem Protein der äußeren Membran her, das bei der Behandlung von ganzen Zellen mit Diimidoestern quervernetzt worden war und deshalb während der Hülsenpräparation nicht mehr wie sonst üblich abge-

löst werden konnte, oder es entsteht während der Ammonolyse durch Spaltung eines größeren Polypeptids. Für die zweite Erklärung spricht, daß eine Bande in vergleichbarer Position auch schon bei Präparationen von "Hülsen ohne Trypsin" beobachtet wurde, die mehrere Tage lang in wässriger Suspension aufbewahrt worden waren (Abb. 7f).

3.2.4 Rundumvernetzung bei niedrigen Temperaturen

Das Malonsäurediimidodimethylester-Molekül ist ungefähr 0,4 nm lang. Die Tatsache, daß Zellen mit diesem Reagens ringsum kovalent vernetzt werden können und die Endprodukte fast ausschließlich aus Protein bestehen, erlaubt entscheidende Rückschlüsse auf die Proteinanordnung in der äußeren Membran. Es galt deshalb auszuschließen, daß die ringsum vernetzten Hülsen Artefakte darstellen. So wäre denkbar, daß Proteine, die im Durchschnitt weiter als 0,4 nm voneinander entfernt sind, aufgrund lateraler Diffusion quervernetzt werden können. Auf diese Weise könnten die in vivo zufällig über die gesamte Zelloberfläche verteilten Membranproteine netzförmig in bestimmten Zonen angereichert werden und aufgrund der kovalenten Verknüpfung zu SDS-Resistenz der

Hülsen führen. Ob die Proteine in der äußeren Membran von E. coli eine laterale Diffusion zeigen, ist nicht bekannt. Diese sollte jedoch, falls überhaupt vorhanden, nur möglich sein, solange das Phospholipid der Membran "flüssig" vorliegt. Deshalb wurden ganze Zellen und "Hülsen ohne Trypsin" mit den Diimidodimethylestern der Malon-, Bernstein-, Adipin- und Korksäure bei Raumtemperatur, 4°C und -10°C (jeweils in Anwesenheit von 30% Glycerin) vernetzt. Bei allen Temperaturen konnten sowohl ganze Zellen wie auch "Hülsen ohne Trypsin" mit allen Reagentien ringsum vernetzt werden; bei Abschätzung der Ausbeute an intakten Hülsen nach Kochen in 1% SDS waren gravierende Unterschiede nicht erkennbar.

3.3 Teilvernetzung von Hülsen und "Hülsen ohne Trypsin" mit Diimidoestern

Hülsen können nach Trypsin-Behandlung mit Diimidoestern nicht mehr rundum quervernetzt werden, sie lösen sich in 1% SDS auf (siehe 3.1). Die nach Vernetzung gelösten Hülsenproteine wurden elektrophoretisch untersucht. Dabei fiel eine Reihe neuer Banden auf, die darauf hindeuten, daß Polypeptidketten über Diimidoester zu Oligomeren verknüpft worden waren (Abb. 8a

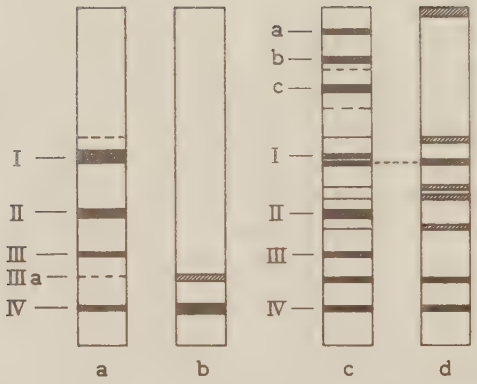


Abb. 8 Markierung des Lipoproteins unvernetzter und vernetzter Hülsen mit 1-^{14}C-Palmitinsäure.

Zellen wurden bei der Anzucht durch Zugabe von 1-^{14}C-Palmitinsäure zum Medium markiert (siehe 2.1.2), die daraus gewonnenen Hülsen mit 70 mM Korksäurediimidodimethylester vernetzt (3 Std.) und in kochendem Probenpuffer (siehe 2.3.2) gelöst. Nach Zentrifugation (10 Min., 48 000 x g) wurde der Überstand unmittelbar für die SDS-Gelelektrophorese verwendet.

a) Elektrophorese unvernetzer Hülsen; b) Autoradiographie davon; c) Elektrophorese vernetzter Hülsen; d) Autoradiographie davon.

und c). Besondere Aufmerksamkeit erregten drei prominente Banden mit geringer Beweglichkeit, die im folgenden (a), (b) und (c) genannt werden. Da sie relativ viel anfärbbares Material enthielten und im Gel von den Nachbarbanden gut getrennt vorlagen, versprach ihre nähere Untersuchung Einblick in die Vorgänge während der Vernetzung.

3.3.1 Markierung des Lipoproteins mit ^{14}C-Palmitinsäure

In den vernetzten Komplexen können als Bestandteile mit Proteincharakter im wesentlichen nur die vier Hauptproteine enthalten sein, alle anderen Banden der äußeren Membran werden von Trypsin weitgehend verdaut. Inwieweit das von BRAUN et al. (10,12,32) beschriebene Lipoprotein quervernetzt wird, konnte durch Markierung mit ^{14}C-Palmitinsäure geklärt werden. Wird Zellen während der Aufzucht ^{14}C-Palmitinsäure angeboten, so findet sich nach der Hülsenpräparation fast die gesamte Radioaktivität im Lipoprotein. Die Autoradiographie entsprechender Gele ließ neben einer starken Markierung der Bande IV nur eine sehr geringe Schwärzung im Bereich der Bande IIIa erkennen (Abb. 8b). Bande IIIa tritt bei Elektrophorese von Hülsen auf, denen noch Lysozym

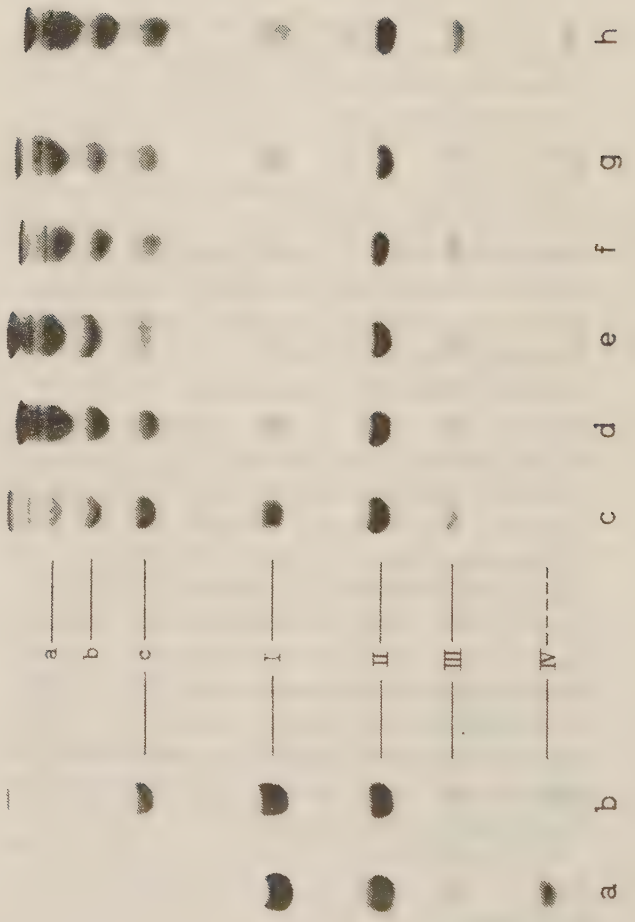
anhaftet (35,37). Natürlich kann die hier beobachtete Radioaktivität nicht von der Lysozym-Bande herrühren. Es mag sich vielmehr um ein weiteres, in geringer Menge vorliegendes Lipoprotein handeln, oder aber - für diese Möglichkeit spricht die Verstärkung der Bande nach Vernetzung - das BRAUN'sche Lipoprotein löst sich nicht vollständig in SDS und liegt teilweise in Aggregaten zusammen mit anderen Bestandteilen der äußeren Membran oder als Dimeres vor.

3.3.2 Konzentrationsabhängigkeit und Kinetik der Teilvernetzung von Hülsen

Während eines Zeitraums von drei Stunden wurden Hülsen mit Korksäurediimidodimethylester bei Raumtemperatur vernetzt, wobei Konzentrationen zwischen 1 mM und 100 mM gewählt wurden. Eine Kontrolle wurde ohne Zugabe von Vernetzungsmitteln entsprechend behandelt. Anschließend wurden die Hülsenproteine durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt, die Gele sind in Abb. 9 wiedergegeben. Alle geeigneten Banden wurden mikrodensitometrisch gemessen. Aus Abb. 10, in der die so gewonnenen Daten zusammengefaßt sind, ist zu ersehen, in welchem Umfang die einzelnen Hülsenproteine in Abhängigkeit von der Diimidoester-Konzentration von der

Vernetzung betroffen wurden und wieviel anfärbbares Material in den Vernetzungsbanden (a), (b) und (c) erschien. Eine Zuordnung von Abnahme einer bestimmten Bande einerseits und Zunahme einer Vernetzungsbande andererseits war nicht möglich. Dennoch konnten vier Feststellungen getroffen werden:
1.) Polypeptid III wird nicht quervernetzt[+]. 2.) Die Polypeptide I und II nehmen an der Vernetzung teil. II wird jedoch selbst bei höheren Diimidoester-Konzentrationen nur teilweise vernetzt, während schon geringe Konzentrationen ausreichen, um fast alle Polypeptidketten I umzusetzen. 3.) Das Lipoprotein der Bande IV wird schon bei geringen Vernetzungsmittelkonzentrationen vollständig vernetzt. Werden dagegen hohe Konzentrationen gewählt, so erfolgt die Vernetzung nur unvollständig. Eine mögliche Erklärung ist, daß dem Lipoprotein ein Reaktionspartner durch eine andere Vernetzungsreaktion entzogen wird, die bei höheren Diimidoester-Konzentrationen schneller abläuft, als die Vernetzung mit dem Lipoprotein. 4.) In den Vernetzungsbanden taucht insgesamt weniger anfärbbares Material auf, als die Bande I durch Vernetzung verliert.

[+] Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde nur die intermolekulare Quervernetzung von Proteinen untersucht. Eine intramolekulare Vernetzung des Polypeptids III ist durchaus möglich.


a
b
c
I
II
III
IV
a b c d e f g h

Auch die Zeitabhängigkeit der Vernetzungsreaktion wurde untersucht. Dabei wurden Hülsen mit 70 mM Korksäurediimidodimethylester 1, 3, 6, 12 und 24 Std. lang inkubiert. Ein Unterschied zwischen den SDS-Gelelektrophoresen dieser Proben war nicht zu erkennen, die Reaktion war also bereits nach einer Stunde weitgehend abgelaufen. Sicherlich ist hierbei von Bedeutung, daß Imidoester in wässrigem Medium leicht hydrolysieren (43). Die Teilvernetzung von Hülsen wurde auch bei einer Temperatur von 4°C durchgeführt. Diese Änderung der Reaktionsbedingungen blieb ohne Auswirkung auf die erkennbaren Reaktionsprodukte.

Abb. 9 Konzentrationsabhängigkeit der Teilvernetzung von Hülsen mit Korksäurediimidodimethylester.

Trypsinisierte Hülsen wurden mit Korksäurediimidodimethylester vernetzt (siehe 2.2.8), in kochendem Probenpuffer (siehe 2.3.2) gelöst und durch SDS-Gelelektrophorese geprüft. Vernetzungsmittel-Konzentrationen: 0 M (a), 4 mM (b), 7 mM (c), 10 mM (d), 40 mM (e), 70 mM (f), 100 mM (g); (h) dasselbe Gel wie (f), jedoch stärker belichtet, um Bande IV besser sichtbar zu machen.

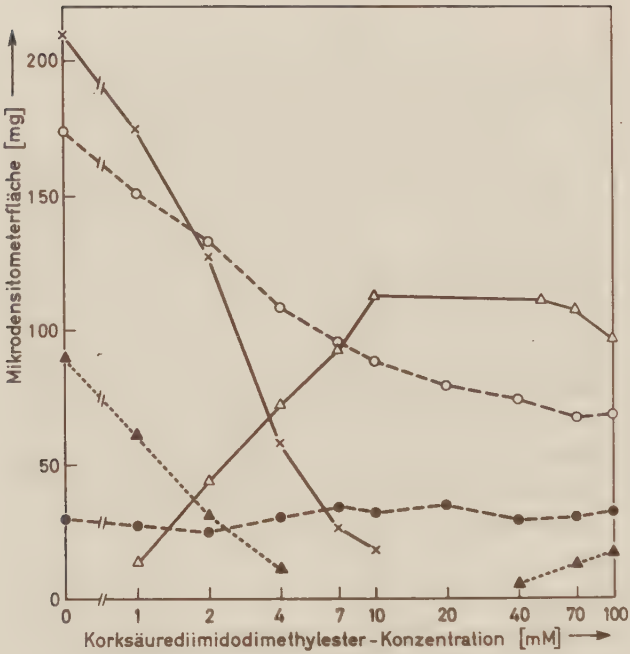


Abb. 10 Konzentrationsabhängigkeit der Teilvernetzung von Hülsen mit Korksäurediimidodimethylester.

Die in Abb. 9 wiedergegebenen Gele wurden mikrodensitometrisch vermessen; als Maß für die Farbintensität der einzelnen Banden ist das Gewicht der ausgeschnittenen Peaks aufgetragen (siehe 2.3.4).

(×———×) Bande I; (o– – –o) Bande II; (●–·–·–●) Bande III; (▲------▲) Bande IV; (△———△) Summe der Banden (a), (b) und (c).

Es bleibt anzumerken, daß sich die fotografische Wiedergabe der Gele als recht schwierig erwies. Die Banden unterschieden sich hinsichtlich ihrer Farbintensität so stark, daß schwache Vernetzungsbanden nur auf den Bildern stark überladener Gele in Erscheinung traten, bei denen andererseits die Hauptbanden zu breiten Zonen verschmiert waren. Es wurde deshalb der Abbildung von weniger überladenen Gelen der Vorzug gegeben und in Kauf genommen, daß die schwachen Vernetzungsbanden nicht zu erkennen sind. Diese sind aus der schematischen Darstellung Abb. 8 zu ersehen, die auf der elektrophoretischen Prüfung mehrerer, unabhängiger Versuchsreihen beruht, wobei von jeder Probe jeweils verschiedene Mengen aufgetragen worden waren.

3.3.3 Konzentrationsabhängigkeit der Teilvernetzung von "Hülsen ohne Trypsin"

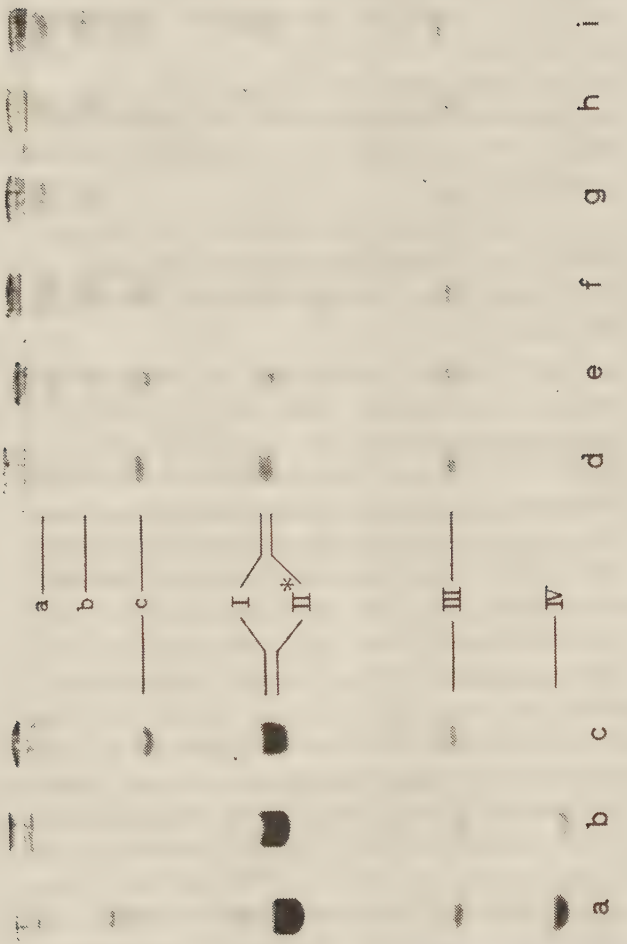
"Hülsen ohne Trypsin" werden durch 100 mM Diimidoester bei einer Ausbeute von 70% rundum vernetzt und damit SDS-unlöslich (siehe 3.2). Es lag nahe, zu vermuten, daß die Rundumvernetzung über oligomere Zwischenprodukte verläuft. Ein Vergleich dieser Zwischenprodukte mit den bei Vernetzung trypsinisierter Hülsen beobachteten Vernetzungskomplexen könnte Hinweise

auf das Verhalten von II* bei der Rundumvernetzung liefern. Deshalb wurden entsprechend der Teilvernetzung von Hülsen auch "Hülsen ohne Trypsin" mit Korksäurediimidodimethylester in Konzentrationen zwischen 1 mM und 100 mM behandelt. Allerdings wurden hier vor SDS-Gelelektrophorese die hochmolekularen Vernetzungsaggregate abzentrifugiert, um zu verhindern, daß die Gele an der Oberfläche verstopft und kleinere Zwischenprodukte zurückgehalten werden. Die so erzielten Gele sind in Abb. 11 wiedergegeben. In welchem Maß die einzelnen Hülsenproteine bei bestimmter Diimido-

---

Abb. 11 Konzentrationsabhängigkeit der Teilvernetzung von "Hülsen ohne Trypsin" mit Korksäurediimidodimethylester.

"Hülsen ohne Trypsin" wurden nach dem Harnstoff-Schritt der Hülsenpräparation mit Korksäurediimidodimethylester vernetzt (siehe 2.2.8), mit Lysozym behandelt und in Probenpuffer (siehe 2.3.2) 5 Min. gekocht. Nach Zentrifugation (10 Min., 48 000 x g) wurde der Überstand unmittelbar für die SDS-Gelelektrophorese verwendet. Vernetzungsmittel-Konzentrationen: 0 M (a), 2 mM (b), 4 mM (c), 7 mM (d), 10 mM (e), 20 mM (f), 40 mM (g), 70 mM (h), 100 mM (i).


a
b
c
I
II*
III
IV
a b c d e f g h i

ester-Konzentration umgesetzt wurden, ist in Abb. 12 graphisch dargestellt. Die Menge des anfärbbaren Materials in den Vernetzungsbanden wurde nicht gemessen, da die abzentrifugierten hochmolekularen Aggregate ohnehin den Großteil des vernetzten Materials ausmachen.

Ein Vergleich mit den bei der Teilvernetzung von Hülsen erzielten Ergebnissen (3.3.1 und 3.3.2) ermöglicht zwei gewichtige Aussagen:

1.) Auch bei der Vernetzung von "Hülsen ohne Trypsin" traten drei prominente Vernetzungsbanden auf, die (a), (b) und (c) zu entsprechen schienen. Die Identität dieser Banden konnte durch SDS-Gelelektrophorese einer Mischung von jeweils teilvernetzten Hülsen und "Hülsen ohne Trypsin" bestätigt werden; eine Aufspaltung der Vernetzungsbanden war nicht zu beobachten. Da in "Hülsen ohne Trypsin" Polypeptid II* mit einem Molekulargewicht von etwa 40 000 und in Hülsen das tryptische Fragment mit Molekulargewicht 28 000 vorliegt, sollten Unterschiede in der elektrophoretischen Beweglichkeit der Vernetzungsbanden erkennbar sein, würden diese II* bzw. II enthalten. Da auch bei "Hülsen ohne Trypsin" Polypeptid III nicht quervernetzt wird (Abb. 12), kommt als Bestandteil der Vernetzungsbanden (a), (b) und (c) mit Proteincharakter nur Polypeptid I in Frage, wenn man davon ausgeht, daß auch die bei der Vernetzung

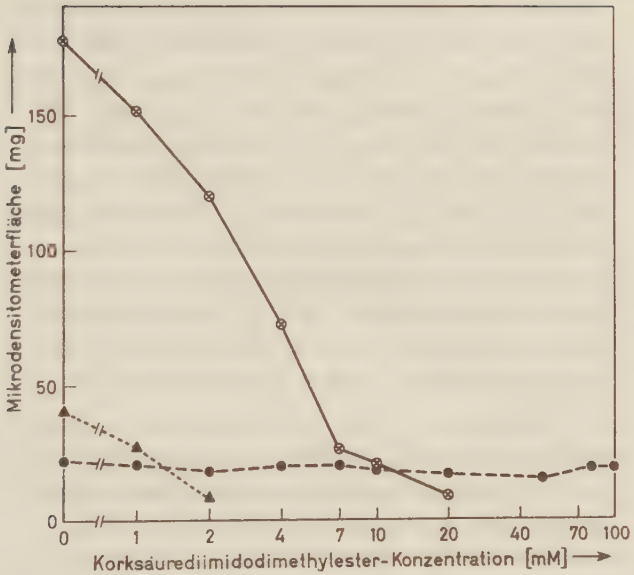


Abb. 12 Konzentrationsabhängigkeit der Teilvernetzung von "Hülsen ohne Trypsin" mit Korksäurediimidodimethylester.

Die in Abb. 11 wiedergegebenen Gele wurden mikrodensitometrisch vermessen; als Maß für die Farbintensität der einzelnen Banden ist das Gewicht der ausgeschnittenen Peaks aufgetragen (siehe 2.3.4).

(⊗———⊗) Doppelbande I/II*; (●----●) Bande III; (▲·····▲) Bande IV.

von "Hülsen ohne Trypsin" erzielten Komplexe (a), (b) und (c) kein Lipoprotein (Bande IV) enthalten. Durch die in Abschnitt 3.3.1 beschriebenen Versuche wurde dies streng genommen nur für die durch Vernetzung trypsinisierter Hülsen erzielten Vernetzungsbanden (a), (b) und (c) bewiesen; eine unterschiedliche Zusammensetzung der in beiden Fällen beobachteten Vernetzungskomplexe erscheint jedoch aufgrund der völlig übereinstimmenden elektrophoretischen Beweglichkeit der Vernetzungsbanden sehr unwahrscheinlich.

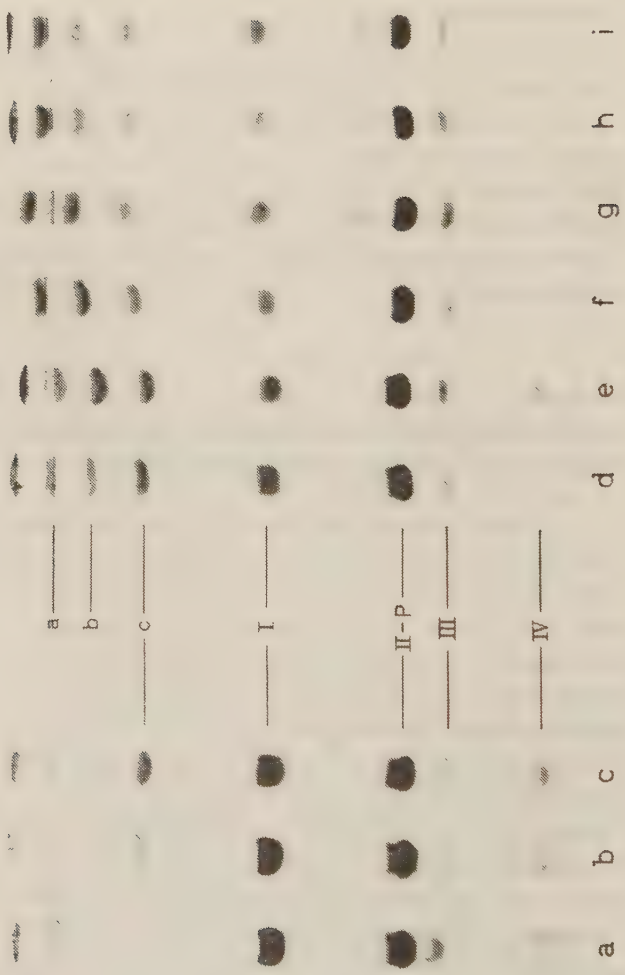
2.) Die Banden I und II* konnten mikrodensitometrisch nicht getrennt gemessen werden, da sie eine Doppelbande bilden. Doch auch anhand der Gele war deutlich zu erkennen, daß II* ähnlich wie I schon bei geringen Vernetzungsmittel-Konzentrationen fast vollständig umgesetzt wurde, während in trypsinisierten Hülsen nur etwa die Hälfte der Polypeptidketten II quervernetzt worden war. Die mikrodensitometrische Messung der Doppelbande I/II* zeigte, daß beide Banden zusammen bei zunehmender Konzentration an Diimidoester mit etwa gleicher Rate abnehmen wie die Bande I in trypsinisierten Hülsen; II weist dort eine deutlich geringere Vernetzungsrate auf. Der in Abschnitt 3.1 geschilderte ursächliche Zusammenhang zwischen Spaltung von Polypeptid II* und Verlust der Rundumvernetzbarkeit äußert sich also auch in unterschiedlichen Vernetzungseigenschaf-

ten von Polypeptid II* und dessen tryptischem Fragment II.

Zu erwähnen ist noch, daß auch bei "Hülsen ohne Trypsin" geringe Konzentrationen an Diimidoestern ausreichten, um das gesamte Lipoprotein der Bande IV umzusetzen. Im Gegensatz zu der bei Hülsen gemachten Beobachtung war aber hier auch bei hohen Konzentrationen eine unvernetzte Fraktion nicht zu erkennen.

3.3.4 Konzentrationsabhängigkeit der Teilvernetzung von Pronase-behandelten Hülsen

Werden Hülsen nach der Hülsenpräparation einschließlich des Trypsinschritts zusätzlich mit Pronase behandelt, so wird das Lipoprotein völlig verdaut (Bande IV verschwindet) und vom tryptischen Fragment II wird ein weiteres Bruchstück abgespalten. Statt Bande II erscheint eine neue Bande, deren elektrophoretische Beweglichkeit einem Molekulargewicht von etwa 22 000 entspricht (35,37). Auch an solchen Pronase-behandelten Hülsen wurde eine Teilvernetzung mit verschiedenen Konzentrationen Korksäurediimidodimethylester vorgenommen. SDS-Gelelektrophorese der einzelnen Proben (Abb. 13) und mikrodensitometrische Messung der Banden (Abb. 14) zeigen, daß die Vernetzung von Pronase-behandelten Hülsen in


a
b
c
I
II-P
III
IV
a
b
c
d
e
f
g
h
i

allen wesentlichen Punkten der Vernetzung von normalen Hülsen entspricht:

Polypeptid III wird nicht quervernetzt. Neben einigen weitaus schwächeren Banden dominieren wiederum drei Vernetzungsbanden. Durch Elektrophorese einer Mischung von vernetzten "Hülsen ohne Trypsin" und vernetzten Pronase-Hülsen wurde nachgewiesen, daß es sich hierbei um die Banden (a), (b) und (c) handelt. Dies bestätigt die in Abschnitt 3.3.3 getroffene Feststellung, daß als einziger Bestandteil dieser Vernetzungsbanden mit Proteincharakter Poly-

---

Abb. 13 Konzentrationsabhängigkeit der Teilvernetzung von Pronase-behandelten Hülsen mit Korksäurediimidodimethylester.

Hülsen wurden nach Durchlaufen der gesamten Hülsenpräparation mit Pronase behandelt (siehe 2.2.1), dann mit Korksäurediimidodimethylester vernetzt (siehe 2.2.8), in kochendem Probenpuffer (siehe 2.3.2) gelöst und durch SDS-Gelelektrophorese geprüft. Vernetzungsmittel-Konzentrationen: 0 M (a), 1 mM (b), 2 mM (c), 4 mM (d), 7 mM (e), 10 mM (f), 40 mM (g), 70 mM (h), 100 mM (i).

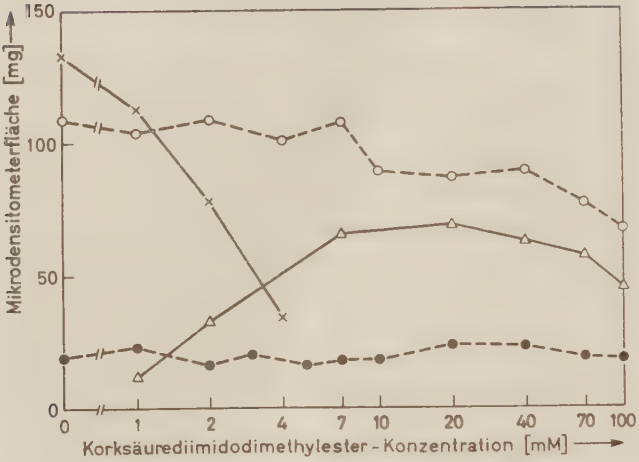


Abb. 14 Konzentrationsabhängigkeit der Teilvernetzung von Pronase-behandelten Hülsen mit Korksäurediimidodimethylester.

Die in Abb. 13 wiedergegebenen Gele wurden mikrodensitometrisch vermessen; als Maß für die Farbintensität der einzelnen Banden wurde das Gewicht der ausgeschnittenen Banden aufgetragen (siehe 2.3.4).

(×———×) Bande I; (o– – –o) Bande II-P; (●– – –●) Bande III; (△———△) Summe der Banden (a), (b) und (c).

peptid I in Frage kommt. Die unterschiedlichen Molekulargewichte von II* und dem nach Trypsin- und Pronase-Behandlung davon verbliebenen Fragment sollten sich nämlich auf jeden Fall durch Unterschiede in der elektrophoretischen Beweglichkeit bemerkbar machen, wäre II* oder eines seiner Fragmente in den Vernetzungsbanden enthalten. Im Einklang damit steht die Beobachtung, daß auch bei Pronase-Hülsen die Banden (a), (b) und (c) insgesamt weniger anfärbbares Material enthalten, als Polypeptid I vernetzt wurde. Eine weitere Parallele zur Vernetzung von trypsinisierten Hülsen besteht darin, daß Bande I mit zunehmender Diimidoester-Konzentration weitaus schneller abnimmt als Bande II-P, die das Pronase-Fragment von II enthält.

Bei den in Abb. 13 dargestellten Gelen ist die Bande IV deutlich zu erkennen. Das verwendete Material enthielt also nach der Pronase-Behandlung zumindest noch einen Teil des Lipoproteins. Die Vernetzung wurde jedoch auch mehrmals an Hülsen wiederholt, deren Lipoprotein während der Pronase-Behandlung völlig abgebaut worden war; dabei traten dieselben Vernetzungsbanden auf.

3.3.5 Teilvernetzung von intakten Zellen

Die Beobachtung, daß kovalent verknüpfte Oligomere bei der Vernetzung von "Hülsen ohne Trypsin" als Vorstufe zur Rundumvernetzung und bei der Vernetzung von trypsinisierten Hülsen als Endprodukt auftreten und daß ferner als Hauptbestandteil der Vernetzungsaggregate mit Proteincharakter nach Ausschluß der Kandidaten II*, III und IV nur noch Polypeptid I in Frage kommt, steht in Einklang mit der Annahme einer Proteinmatrix in der äußeren Membran, die zumindest I und II* als "repeating subunits" enthält (Hinweise auf II* als "repeating subunits" geben die Versuche zur Rundumvernetzung; siehe Diskussion).

Zwei mögliche Einwände dürfen aber nicht übersehen werden: Zum einen fehlt der direkte Nachweis, daß die Vernetzungsaggregate (a), (b) und (c) tatsächlich Polypeptid I enthalten (die im nächsten Abschnitt 3.3.6 beschriebene Bestimmung der scheinbaren Molekulargewichte spricht für diese Annahme, kann aber nicht als Beweis gelten), zum anderen könnten die Vernetzungsaggregate Artefakte darstellen, die erst nach der Zerstörung der Membranstruktur durch die Hülsenpräparation auftreten und deshalb zu einer Aussage über die Verhältnisse in der nativen Membran nicht berechtigen.

Um den letzten Einwand auszuräumen, wurden auch ganze Zellen mit verschiedenen Konzentrationen Korksäurediimidodimethylester teilvernetzt, zu Hülsen aufgearbeitet (einschließlich des Trypsinschritts) und in kochendem 1% SDS (Probenpuffer) gelöst. Nach Zentrifugation (10 Min., 48 000 x g) wurde der Überstand elektrophoretisch geprüft (Abb. 15). Die Gele wiesen stets

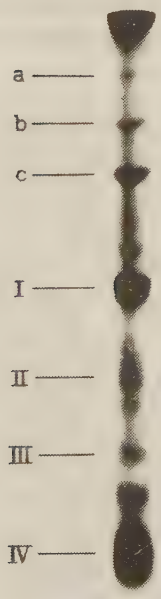


Abb. 15

Teilvernetzung ganzer Zellen mit Korksäurediimidodimethylester.

Ganze Zellen wurden mit 70 mM Korksäurediimidodimethylester 3 Std. vernetzt, entsprechend der Hülsenpräparation (einschließlich des Trypsinschritts) aufgearbeitet und in kochendem Probenpuffer (siehe 2.3.2) gelöst. Nach Zentrifugation (10 Min., 48 000 x g) wurde der Überstand unmittelbar für die SDS-Gelelektrophorese verwendet.

eine starke Hintergrundfärbung auf, wahrscheinlich verursacht durch hochmolekulare Vernetzungskomplexe, die an der Oberfläche der Gele zurückgehalten wurden und ein gleichmäßiges Einziehen der übrigen Probe verhinderten. Dennoch sind drei prominente Vernetzungsbanden deutlich zu erkennen; ihre elektrophoretische Beweglichkeit weist sie als (a), (b) und (c) aus.

3.3.6 Scheinbares Molekulargewicht der Vernetzungsprodukte (a), (b) und (c)

Eine Ammonolyse der drei Vernetzungskomplexe (a), (b) und (c) erschien am ehesten geeignet, deren Zusammensetzung eindeutig zu klären. Verschiedene Versuchsbedingungen wurden erprobt: Stets wurden aus den Gelen der SDS-Gelelektrophorese die drei Vernetzungsbanden ausgeschnitten. Die so gewonnenen Gelstückchen wurden entweder unmittelbar in Ammoniak-Essigsäure-Mischung (mit oder ohne 1% SDS) gegeben, oder das anfärbbare Material wurde eluiert, lyophilisiert und erst anschließend der Ammonolyse unterworfen. Außerdem wurde die Dauer der Ammonolyse im Laufe mehrerer Versuche von 24 Std. bis auf 15 Min. reduziert. Ferner erfolgte eine ^{14}C-Markierung der Hülsenproteine durch Zugabe einer Mischung von radioaktiven Aminosäuren zum Medium bei der

Aufzucht der Zellen, um die Herkunft des nach Ammonolyse verbliebenen Materials zu klären. Die SDS-Gelelektrophorese des ammonolysierten Materials ergab stets Gele, in denen vor stark gefärbtem Hintergrund einige breit verschmierte Banden zu erkennen waren. Die Autoradiographie solcher Gele zeigte, daß die Verteilung der Radioaktivität jeweils der Verteilung des anfärbbaren Materials entsprach. Offensichtlich ist unter den gewählten Bedingungen eine Ammonolyse der Vernetzungskomplexe ohne starke Fragmentierung der darin enthaltenen Polypeptidketten nicht möglich.

Um weitere Hinweise auf die Komponenten der Vernetzungsprodukte zu erhalten, verblieb neben einer aufwendigen Isolierung dieser Vernetzungskomplexe durch Säulenchromatographie und anschließender Prüfung mit Methoden der Proteinchemie vor allem die Bestimmung der scheinbaren Molekulargewichte durch SDS-Gelelektrophorese. Eine positive Aussage ließ diese Methode allerdings nur unter bestimmten Bedingungen erwarten: Sollten die Molekulargewichte der Vernetzungsaggregate Vielfache des Molekulargewichts von Polypeptid I darstellen, so wäre dies ein gewichtiges Argument dafür, daß es sich bei den Vernetzungskomplexen um Oligomere von Polypeptid I handelt.

Eine zuverlässige Bestimmung des Molekulargewichts durch SDS-Gelelektrophorese ist nur bei Proteinen möglich, die unter den Bedingungen der Elektrophorese "normales" Verhalten zeigen (Referenzen sind aus (2) zu ersehen):

Proteine binden in der Regel so viel SDS (ungefähr 1 g SDS pro g Protein), daß die ursprüngliche Ladung die elektrophoretische Beweglichkeit der stark negativ geladenen SDS-Protein-Komplexe kaum beeinflußt. Die SDS-Protein-Komplexe besitzen meist stäbchenförmige Gestalt, ihre Größe hängt vom Molekulargewicht ab (68). Die beiden für die elektrophoretische Beweglichkeit maßgebenden Faktoren, Ladung und räumliche Ausdehnung der Moleküle, sind also direkt vom Molekulargewicht abhängig. Abweichende Eigenschaften besitzen Proteine mit ungewöhnlicher Ladung oder Konformation, mit Kohlehydrat-Substituenten oder oxydierten Sulfhydrylgruppen. Eine Unterscheidung zwischen "normalem" und "anormalem" Verhalten ist durch Bestimmung der freien elektrophoretischen Beweglichkeit (M_o) und des Retardationskoeffizienten (K_R) möglich, die in beiden Fällen durch Veränderung des Acrylamidgehalts der verwendeten Gele erfolgt.

In Anlehnung an diese Methode wurden die scheinbaren Molekulargewichte der Ver-

netzungskomplexe anhand von Vergleichsproteinen in Gelen ermittelt, deren Acrylamidgehalt zwischen 4% und 8% lag. Das scheinbare Molekulargewicht von Proteinen mit "normalem" Verhalten sollte unabhängig von der gewählten Acrylamidkonzentration konstant bleiben.

Da monomere Vergleichsproteine mit einem Molekulargewicht von über 100 000 nicht zur Verfügung standen, wurde Ovalbumin (MG 43 000) unter den von CARPENTER und HARRINGTON (17) vorgeschlagenen Bedingungen mit Korksäurediimidodimethylester vernetzt. SDS-Gelelektrophorese des so gewonnenen Gemisches ließ deutlich bis zu sechs Banden erkennen, die dem monomeren Ovalbumin und den entsprechenden Oligomeren entsprachen. In Abb. 16 sind die Molekulargewichte logarithmisch gegen die in 4- und 8%igen Gelen gemessenen R_f-Werte aufgetragen. Die Punkte liegen bei einem Acrylamidgehalt von 4% fast exakt auf einer Geraden, und selbst bei Verwendung von Gelen mit 8% Acrylamid ist die Linearität im Molekulargewichtsbereich bis 130 000 ausreichend für die bei der vorliegenden Fragestellung notwendige Meßgenauigkeit.

In Tabelle 2 sind die bei unterschiedlicher Acrylamidkonzentration für Protein I und die Vernetzungskomplexe (a), (b) und (c) ermittelten scheinbaren Molekulargewichte zusammengefaßt. Bei Auswertung der Daten ist

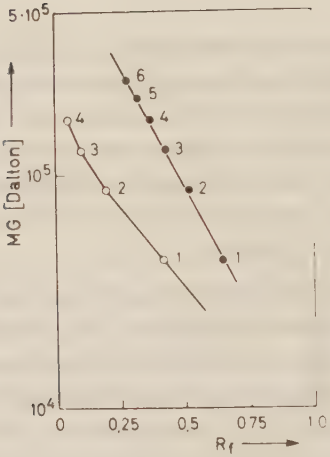


Abb. 16 Molekulargewichte der Standardproteine logarithmisch aufgetragen gegen die hierfür ermittelten R_f-Werte.

Ein nach CARPENTER und HARRINGTON (17) hergestelltes Gemisch (siehe 2.3.3), das monomeres Ovalbumin (MG 43 000) sowie kovalent verknüpfte Oligomere davon enthielt, wurde durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt. Die R_f-Werte der einzelnen Banden wurden mikrodensitometrisch ermittelt. Dargestellt sind die mit höchster und geringster Acrylamidkonzentration erzielten Werte. (o——o) Gele mit 8% Acrylamid, (•——•) Gele mit 4% Acrylamid. R_f-Werte für monomeres (1), dimeres (2), trimeres (3), quadromeres (4), pentameres (5) und hexameres (6) Ovalbumin.

Acrylamid-konzentration der Gele	Ermitteltes scheinbares Molekulargewicht für Bande			
	(a)	(b)	(c)	I
4,0%	102 000	102 000	68 000	35 000
4,5%	102 000	102 000	70 000	40 000
5,0%	105 000	98 000	68 000	38 000
5,5%	105 000	96 000	68 000	37 000
6,0%	105 000	92 000	68 000	38 000
7,0%	105 000	93 000	67 000	37 000
8,0%	105 000	86 000	66 000	35 000

Tab. 2: Scheinbare Molekulargewichte der Banden (a), (b), (c) und I, ermittelt in Gelen mit verschiedener Acrylamidkonzentration. Als Standard diente ein Gemisch monomeren und oligomeren Ovalbumins, das nach (17) vernetzt worden war (siehe Abschn. 2.3.3).

zu berücksichtigen, daß die Art der Quervernetzung von mehreren Untereinheiten ("Kopf an Kopf" oder "Seite an Seite") das scheinbare Molekulargewicht stark beeinflußt. So sollte das scheinbare Molekulargewicht eines Dimeren, das zwei identische Untereinheiten in "Seite an Seite"-Verknüpfung enthält, beträchtlich weniger als das Doppelte vom scheinbaren Molekulargewicht einer Untereinheit betragen.

Die ermittelten Molekulargewichte sprechen zusammen mit den in den Abschn. 3.3.1 bis 3.3.4 beschriebenen Ergebnissen dafür, daß die Banden (c) und (a) Vernetzungskomplexe enthalten, die aus zwei bzw. drei Polypeptidketten I bestehen. Der Vernetzungskomplex (b) verhält sich bei SDS-Gelelektrophorese "anormal". Eine Kohlenhydratkomponente als Bestandteil (z.B. bei Quervernetzung von Polypeptid I mit Lipopolysaccharid) würde dieses Verhalten erklären. Versuche, Bestandteile mit Nicht-Protein-Charakter nachzuweisen wurden zunächst allerdings nicht unternommen.

3.4 Teilvernetzung von Hülsen der temperatursensitiven rod-Mutante lss12

Die Mutante lss12 unterscheidet sich wahrscheinlich durch eine Einschrittmutation vom Wildtyp 3282 (36). Sie wächst bei 30°C in Form von stäbchenförmigen Zellen, die sich nach Erhöhung der Wachstumstemperatur auf 42°C in Kugeln umwandeln. Dieser Vorgang ist reversibel. In Anwesenheit von 2 mM Mg^{2+} erfolgt auch bei 42°C weiterhin unbegrenzt Zellteilung, während ohne Mg^{2+} die Kugeln langsam zu lysieren beginnen. Zugabe von 12% Rohrzucker beschleunigt das Wachstum in Anwesenheit von Mg^{2+}. Kugeln und Stäbchen unterscheiden sich nicht in Zusammensetzung, Grad der Vernetzung und Dicke ihres Mureins. Obwohl die Mutation ohne Zweifel die Zellwand berührt, konnte ein Defekt in der Cytoplasmamembran oder in der äußeren Membran bisher nicht lokalisiert werden.

Aus den kugelförmigen Zellen lassen sich Hülsen herstellen, die Kugelform beibehalten. Solche Hülsen wurden mit Korksäurediimidodimethylester vernetzt, um mögliche Veränderungen im Gefüge der Proteine in der äußeren Membran zu erkennen. Zur Kontrolle wurden stäbchenförmige Hülsen von Zellen des Wildtyps, die ebenfalls bei 42°C gezogen worden waren, vernetzt, um einen möglichen Einfluß der Wachstumstemperatur auszuschließen. Die vernetzten Hülsen lösten sich wie erwar-

tet in kochendem 1% SDS auf. Die gelösten Proteine wurden durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt (Abb. 17). Ein Unterschied zwischen den entsprechenden Proben von 1ss12 und 32ö2 war nicht zu erkennen. In beiden Fällen traten die bereits bekannten Vernetzungskomplexe (a), (b) und (c) in Erscheinung.

3.5 Versuche mit Minizellen und stäbchenförmigen Zellen des Stammes P678-54: Hülsenpräparation, mikrodensitometrische Messung der Hauptbanden, Teilvernetzung mit Diimidoestern

Wird bei der Teilung eines stäbchenförmigen Bakteriums das Septum nicht in der äquatorialen Ebene, sondern nahe bei einer der beiden Polkappen angelegt, so entstehen nicht zwei gleich große Tochterzellen, sondern eine stäbchenförmige Zelle, die annähernd die Ausmaße der Mutterzelle

---

Abb. 17 Teilvernetzung von Hülsen der temperatursensitiven rod-Mutante lss12.

Aus stäbchenförmigen Zellen des Wildtyps 3282 und aus kugeligen Zellen der Mutante lss12 (Wachstumstemperatur in beiden Fällen 42°C) wurden Hülsen isoliert, mit Korksäurediimidodimethylester 3 Std. vernetzt und in kochendem Probenpuffer (siehe 2.3.2) gelöst. Die Hülsenproteine wurden durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt.

Stäbchenförmige Zellen, vernetzt mit 0 M (a), 4 mM (b) und 40 mM (c) Korksäurediimidodimethylester; kugelige Zellen, vernetzt mit 0 M (d), 4 mM (e) und 40 mM (f) Korksäurediimidodimethylester.

besitzt und eine kugelige sogenannte Minizelle. Man muß klar unterscheiden zwischen Kugeln der Mutante lss12 oder Sphäroplasten einerseits, deren Oberfläche mindestens der von stäbchenförmigen Zellen entspricht, und den wesentlich kleineren Minizellen andererseits, die bedingt durch die Art ihrer Entstehung denselben Durchmesser wie ihre Mutterzelle aufweisen. Minizellen enthalten alle Bestandteile des Cytoplasmas, besitzen aber keine DNS und können sich folglich auch nicht durch Teilung vermehren. Ihre Zellwand kann als Polkappenmaterial gelten. Da bei stäbchenförmigen Zellen die Polkappen nur einen geringen Teil der gesamten Oberfläche ausmachen, könnte ein Vergleich zwischen Minizellen und stäbchenförmigen Zellen zur Klärung der Frage beitragen, inwieweit die Polkappen eine von der übrigen Zellhülle abweichende Struktur aufweisen.

Der von ADLER (1) isolierte Stamm P678-54 bildet wahrscheinlich aufgrund einer genetischen Veränderung nahe der gal-Region des Chromosoms unabhängig von der normalen Zellteilung Minizellen in hoher Rate. In der Kulturflüssigkeit kommt eine Minizelle auf zwei stäbchenförmige Zellen, doch ist durch differentielle Zentrifugation eine starke Anreicherung möglich (die hier verwendeten Präparationen enthielten etwa eine stäbchenförmige Zelle pro 300-500 Minizellen).

Zunächst wurde versucht, die Hülsenpräparation auf Stäbchen- und Minizellen des Stammes P678-54 zu übertragen. Dabei erwiesen sich Minizellen als resistent gegenüber Trypsin und Pronase. Bei Einwirkung von Trypsin wurde höchstens ein geringer Teil von II* gespalten, eine anschließende Behandlung mit Pronase P zeigte keine Folgen. Auch die zahlreichen nur in geringer Menge in der äußeren Membran vorliegenden Proteine (siehe Abschn. 3.1) wurden von Trypsin und Pronase nicht oder zumindest nicht vollständig abgebaut. Stäbchenförmige Zellen dagegen zeigten hinsichtlich beider Effekte das gewohnte Bild. Diese Beobachtung läßt allerdings nicht auf unterschiedliche Feinstruktur der äußeren Membran schließen. Es ist nämlich durchaus denkbar, daß der erste Schritt der Hülsenpräparation (1 Vol.-% Triton X-100, 40% Rohrzucker) bei Minizellen und stäbchenförmigen Zellen unterschiedliche Auswirkungen zeitigt (z.B. aufgrund unterschiedlicher Plasmolyse-Eigenschaften von Stäbchen und wesentlich kleineren Kugeln), was sich dann in veränderter Zugänglichkeit gegenüber Trypsin und Pronase äußern könnte.

Um dies zu überprüfen, wurden Mini- und Stäbchenzellen gleichermaßen so lange mit Ultraschall behandelt, bis in der Suspension der bei weitem widerstandsfähigeren Minizellen keine intakten Kugeln mehr zu erkennen waren. Die Zellwandbruchstücke wurden ab-

zentrifugiert und entsprechend der üblichen Hülsenpräparation weiterbehandelt. SDS-Gelelektrophorese ergab das normale Bandenmuster. Auch in den Gelen der Minizellen fehlten die zahlreichen, zuvor beobachteten, schwächeren Banden. Im Gegensatz zu intakten Hülsen aus Minizellen (oder besser gesagt, den kugeligen Gebilden, die aus Minizellen durch Hülsenpräparation gewonnen wurden und deren Aufbau nicht näher untersucht wurde) sind entsprechend behandelte Bruchstücke der äußeren Membran von Minizellen also nicht resistent gegenüber Trypsin.

Minizellen schienen zur Klärung der Frage geeignet, inwieweit das Verhältnis der Hauptproteine im Bereich der Polkappen von den für die gesamte Oberfläche ermittelten Durchschnittswerten abweicht. Deshalb wurden nach SDS-Gelelektrophorese von Bruchstücken der äußeren Membran (gewonnen durch Beschallung ganzer Zellen und anschließende Hülsenpräparation) die Banden I, II und IV mikrodensitometrisch gemessen. Bei zwei voneinander unabhängigen Versuchen stimmten die Farbintensitäten der Banden II und IV jeweils bei Stäbchen- und Minizellen weitgehend überein. Für Bande I lagen die Werte bei Minizellen im einen Fall 50%, im anderen Fall etwa 15% über denen von Stäbchenzellen. Aufgrund der methodisch bedingten Ungenauigkeit mikrodensitometrischer Messungen von

Elektrophorese-Gelen kann von signifikanten Unterschieden also nicht gesprochen werden.

Um eine möglicherweise grob veränderte räumliche Anordnung der Hauptproteine in der äußeren Membran von Minizellen zu erkennen, wurden die durch Ultraschallbehandlung aus Minizellen gewonnenen Wandbruchstücke nach Durchlaufen der Hülsenpräparation mit verschiedenen Konzentrationen Korksäurediimidodimethylester vernetzt. Unterschiede zur Teilvernetzung von trypsinisierten Hülsen waren nicht zu beobachten. Auch hier traten die Vernetzungskomplexe (a), (b) und (c) auf.

3.6 Vernetzung von Hülsen mit Glutaraldehyd

Glutaraldeyd ist von der Elektronenmikroskopie als Fixiermittel bekannt. QUIOCHO und RICHARDS (67) berichteten 1964, daß Carboxypeptidase A-Kristalle durch Behandlung mit Glutaraldehyd wasserunlöslich werden und trotzdem enzymatische Aktivität zeigen. Ein weites Feld von Anwendungsmöglichkeiten tat sich aber erst auf, als 1968 der wahrscheinliche Reaktionsmechanismus aufgezeigt (69) und die Vorgänge bei der Vernetzung von Proteinen näher charakterisiert wurden (30).

Glutaraldehyd polymerisiert in wässriger Lösung durch Aldolkondensation zu α, ß-un-

gesättigten Polyaldehyden. Die Quervernetzung von Proteinen erfolgt nach dem Typ der Michael-Reaktion (Abb. 18) und ist irreversibel. Die kürzeste und wahrscheinlich häufigste Brücke, über die zwei geeignete funktionelle Gruppen miteinander verknüpft werden, umfaßt fünf C-Atome. Diese Länge wäre auch zu erwarten, wenn die

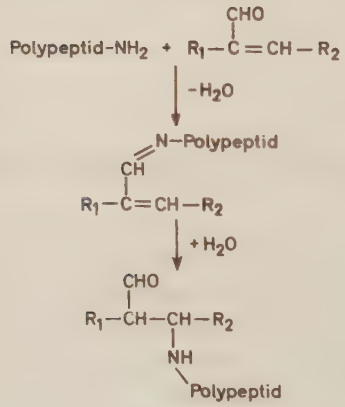
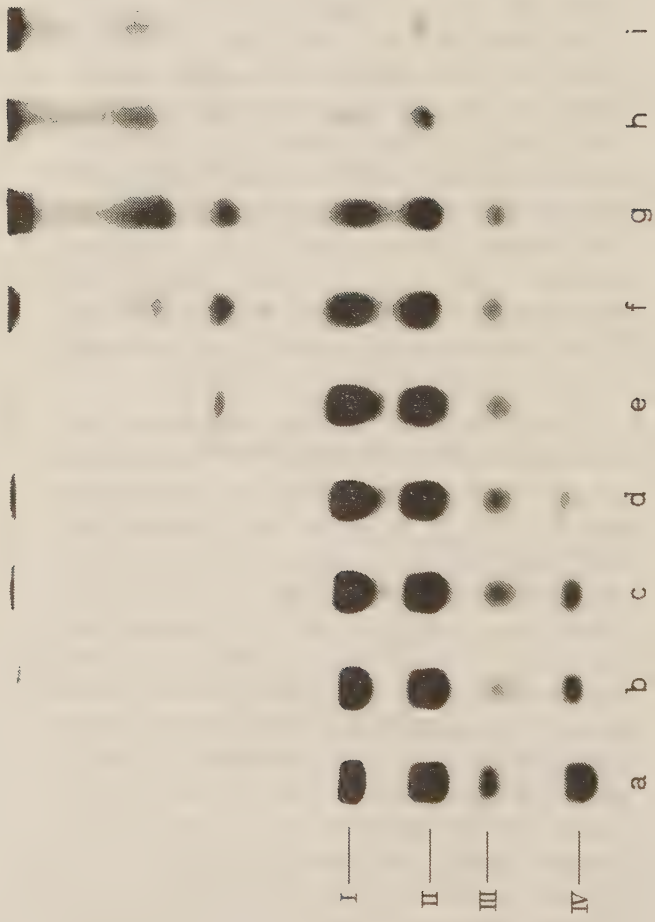


Abb. 18 Vernetzungsreaktion von polymerem Glutaraldehyd mit der Aminogruppe eines Polypeptids (69).

Quervernetzung durch monomeren Glutaraldehyd unter Bildung einer doppelten Schiff'schen Base erfolgen würde. Bei der Quervernetzung von Proteinen überwiegt bei weitem die Verknüpfung über Aminogruppen, wobei den ε-Aminogruppen der Lysinreste aufgrund ihrer größeren Anzahl gegenüber den N-terminalen Aminogruppen der einzelnen Polypeptidketten die größte Bedeutung zukommt. Doch auch Sulfhydrylgruppen können umgesetzt werden. Geringe Reaktivität besitzen außerdem die Phenol- und Imidazolreste von Tyrosin und Histidin.

Trypsinisierte Hülsen wurden mit verschiedenen Konzentrationen von Glutaraldehyd 6 Std. lang vernetzt. Die Proben wurden dann in 1% SDS (Probenpuffer) gekocht und elektrophoretisch untersucht. Die Gele der SDS-Gelelektrophorese sind in Abb. 19 wiedergegeben. Deutlich ist zu erkennen, daß die Vernetzung mit zunehmender Glutaraldehyd-Konzentration über verschiedene Zwischenprodukte fortschreitet. Nach Überschreiten einer bestimmten Größe vermögen die Vernetzungskomplexe nicht mehr in das Polyacrylamid-Gel einzudringen. Die stark vernetzten Proben enthielten Partikel, die im Phasenkontrastmikroskop nur undeutlich zu erkennen waren, die jedoch zumindest teilweise den stäbchenförmigen Hülsen in Größe und Form zu entsprechen schienen. Elektronenmikroskopische Prüfung zeigte jedoch, daß


a
b
c
d
e
f
g
h
i
I
II
III
IV

es sich zumeist um Bruchstücke handelte, von denen allerdings viele erkennen liessen, daß sie durch Bruch stäbchenförmiger Gebilde nahe der äquatorialen Ebene entstanden waren. Daneben waren vereinzelt auch intakte Partikel vorhanden.

Die bei der Vernetzung von Hülsen mit Glutaraldehyd beobachteten SDS-löslichen Zwischenprodukte und SDS-resistenten Partikel wurden aus folgenden Gründen nicht näher untersucht: Zum einen können die kovalent verknüpften Komponenten hier nicht ohne grobe Veränderung zurückgewonnen werden, wie dies nach Vernetzung mit Diimidoestern durch Ammonolyse möglich ist. Zum anderen ist die Vernetzungsreaktion bei

---

Abb. 19 Konzentrationsabhängigkeit der Vernetzung von Hülsen mit Glutaraldehyd.

Trypsinisierte Hülsen wurden 6 Std. mit Glutaraldehyd vernetzt (siehe 2.2.9) und in Probenpuffer (siehe 2.3.2) 5 Min. gekocht. Nach Zentrifugation (10 Min., 12 000 x g) wurde der Überstand unmittelbar für die SDS-Gelelektrophorese verwendet. Vernetzungsmittel-Konzentrationen: 0 M (a), 2,5 mM (b), 5 mM (c), 7,5 mM (d), 10 mM (e), 25 mM (f), 50 mM (g), 75 mM (h), 100 mM (i).

Verwendung von Glutaraldehyd, was überbrückbare Entfernung und mögliche Reaktionspartner anbelangt, nicht sehr spezifisch; Rückschlüsse auf die Feinstruktur der Hülsenmembran sind ohnehin kaum zu erwarten.

3.7 Oxydative Verknüpfung von Proteinen der äußeren Membran zu SDS-resistenten, zellförmigen Hülsen ("Oxydationshülsen")

Im Rahmen der von SCHWEIZER et al. (77, 78) vorgenommenen Untersuchungen zum Aufbau der äußeren Membran des Pseudomonaden Spirillum serpens waren wiederholt Zellhülsen aufgetreten, die kein Murein enthielten und sich trotzdem in kochendem 1% SDS als formstabil erwiesen. Sie lösten sich erst nach Zugabe von Mercaptoäthanol oder Dithiothreitol auf. Diese Beobachtung ließ vermuten, daß benachbarte Sulfhydrylgruppen durch Luftsauerstoff unter Bildung von Disulfidbrücken spontan oxydiert worden waren und somit ein kovalent verknüpftes Netz von Proteinen entstanden war. Eine Bestätigung dieser Annahme erbrachten weitere Versuche, die zeigten, daß SDS-resistente Hülsen reproduzierbar durch Zugabe von $CuSO_4$-o-Phenanthrolin zu erzielen waren. O-Phenanthrolin ist als Chelatbildner bekannt; mit einigen Metallionen, wie Cu^+ und Cu^{2+}, bil-

det es Komplexe, die eine Oxydation von Sulfhydrylgruppen durch Luftsauerstoff katalysieren (49). Spirillum-Hülsen, die mit Jodacetamid vorbehandelt worden waren (Jodacetamid carboxymethyliert freie Sulfhydrylgruppen (29)), konnten nicht SDS-resistent gemacht werden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde überprüft, ob eine oxydative Verknüpfung von Proteinen der äußeren Membran auch bei E. coli möglich ist. Dabei wurde deutlich, daß sich die Zellhülsen von Spirillum serpens und E. coli in vieler Hinsicht gleichen.

3.7.1 Oxydation von Zellhülsen

"Hülsen ohne Trypsin", die aus Zellen des Stammes 3282 gewonnen worden waren, wurden durch Behandlung mit $CuSO_4$-o-Phenanthrolin SDS-resistent; sie behielten selbst in kochendem 4% SDS die ursprüngliche Zellform bei. Wie bei der Vernetzung von "Hülsen ohne Trypsin" mit Diimidoestern wurde die Vernetzung jeweils nach dem Harnstoff-Schritt vorgenommen und das Murein erst anschließend mit Lysozym abgebaut. Trypsinisierte Hülsen konnten auf diese Weise nicht oxydiert werden. Trypsinbehandlung führte bei oxydierten "Hülsen ohne Trypsin" zum Verlust der SDS-

Resistenz, während sich "Oxydationshülsen", die bereits mit kochendem 1% SDS extrahiert worden waren, bei Einwirkung von Trypsin auflösten. Dieselben Effekte waren unter dem Einfluß reduzierender Agentien, wie Mercaptoäthanol oder Dithiothreitol, zu verzeichnen. Nach Zugabe von 100 mM Mercaptoäthanol oder Dithiothreitol lösten sich SDS-extrahierte "Oxydationshülsen" augenblicklich auf, während sich der Abbau durch Trypsin über einige Minuten erstreckte. Mit Jodacetamid vorbehandelte "Hülsen ohne Trypsin" konnten nicht oxydiert werden.

In Abb. 20 sind elektronenmikroskopische Aufnahmen von normalen Hülsen und SDS-extrahierten "Oxydationshülsen" gegenübergestellt. In heißem SDS zerfällt offensichtlich ein Teil der "Oxydationshülsen" in größere Bruchstücke, möglicherweise aufgrund lokaler Läsionen, die schon zuvor beim Resuspendieren der abzentrifugierten Hülsen durch mechanische Beanspruchung entstanden sein könnten. Die Ausbeute an intakten "Oxydationshülsen" wurde auf 50-70% geschätzt.

Eine fortschreitende Fragmentierung war mikroskopisch auch an SDS-extrahierten "Oxydationshülsen" zu beobachten, die über Nacht oder einige Tage lang aufbewahrt worden waren. Hier schienen allerdings proteolytische Aktivitäten maßgebend zu sein. SDS-Gelelektro-

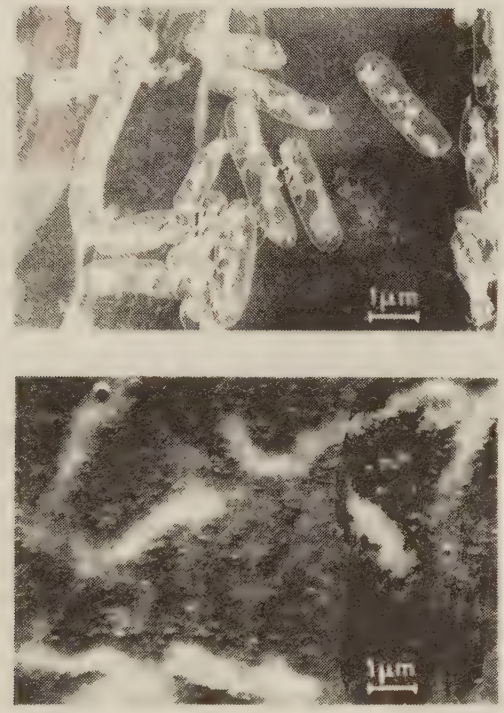


Abb. 20 Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Zellhülsen und "Oxydationshülsen" nach Bedampfung.

Oben: Normale Hülsen. Diese lösen sich in 1% SDS vollständig auf und ergeben bei SDS-Gelelektrophorese das in Abb. 21a wiedergegebene Bandenmuster. Aufnahme entnommen aus (37).
Unten: "Oxydationshülsen"; "Hülsen ohne Trypsin" wurden mit $CuSO_4$-o-Phenanthrolin oxydiert, mit Lysozym behandelt und 5 Min. in 1% SDS gekocht. Sie ergeben nach Reduktion mit Mercaptoäthanol oder Dithiothreitol bei SDS-Gelelektrophorese das in Abb. 21c wiedergegebene Bandenmuster.

phorese von solchen Präparationen zeigte nämlich, daß die "oxydierbaren Proteine" (siehe 3.7.2) weitgehend abgebaut worden waren; der Großteil des mit Coomassie Brilliant Blue anfärbbaren Materials wanderte in einer breit verschmierten Zone mit der Front.

3.7.2 Zusammensetzung der "Oxydationshülsen"

SDS-extrahierte "Oxydationshülsen" wurden mit Perameisensäure oxydiert und durch Aminosäureanalyse untersucht. 80-90% ihres Trockengewichts (nach Lyophilisation) bestanden aus Protein (Werte für zwei verschiedene Präparationen: 81%, 89%). Ein Mol Cystein kam auf 8 000 g Trockensubstanz. Die Proben enthielten weder Aminozucker noch Ketodesoxyoctonat; "Oxydationshülsen" sind also frei von Lipopolysaccharid und Murein. Aufgrund des hohen Proteinanteils wurde die Natur der übrigen Bestandteile, die insgesamt 10% bis höchstens 20% des Trockengewichts ausmachen, nicht näher untersucht.

Neben möglichen Substituenten der "oxydierbaren Proteine" mit Nicht-Protein-Charakter lassen die in Abschn. 3.2.3 geschilderten Versuche vor allem auf einen nach der Lyophilisation verbliebenen rest-

lichen Wassergehalt schließen.

Ein Vergleich der Proteinzusammensetzung von Hülsen, "Hülsen ohne Trypsin" und "Oxydationshülsen" ist anhand der in Abb. 21 wiedergegebenen Elektrophorese-Gele möglich. Die meisten der Proteine, die durch Trypsin schnell abgebaut werden (siehe 3.1), sind in den "Oxydationshülsen" kovalent gebunden enthalten; die Hauptproteine I-IV dagegen sind nicht Bestandteil der "Oxydationshülsen". Bei der Elektrophorese von "Oxydationshülsen" war die Zahl der erkennbaren Banden abhängig von der aufgetragenen Menge an Material. Anhand von verschiedenen Elektrophoresen mehrerer Präparationen konnten etwa 30 Banden unterschieden werden. Die Bandenmuster aller Präparationen stimmten gut überein.

3.7.3 Lokalisation der "oxydierbaren Proteine"

Der Trypsinschritt während der Hülsenpräparation bewirkt neben dem völligen Abbau der "oxydierbaren Proteine" und der Spaltung von II* auch eine Zerstörung der bislang morphologisch weitgehend intakten Cytoplasmamembran (35). Die anschließend im Innern der Hülsen erkennbaren Vesikel bestehen wahrscheinlich aus Material der Cyto-

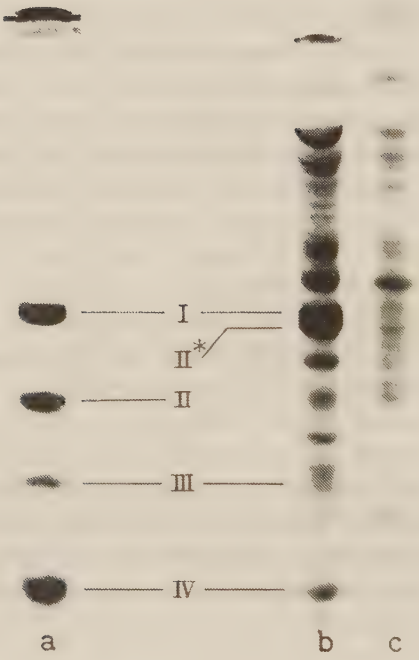


Abb. 21 SDS-Gelelektrophorese:
(a) normale Hülsen,
(b) "Hülsen ohne Trypsin",
(c) "Oxydationshülsen"; "Hülsen ohne Trypsin wurden mit $CuSO_4$-o-Phenanthrolin oxydiert, mit Lysozym behandelt und 5 Min. in Probenpuffer (siehe 2.3.2) gekocht, der statt Mercaptoäthanol 100 mM Dithiothreitol enthielt.

plasmamembran. Da nur solche Hülsen durch Oxydation SDS-resistent gemacht werden konnten, die nicht mit Trypsin behandelt worden waren und somit noch eine morphologisch intakte Cytoplasmamembran besaßen, wäre denkbar, daß die "oxydierbaren Proteine" in der äußeren oder in der inneren Membran oder in beiden lokalisiert sind. Diese Frage wurde anhand von Sacculi geklärt, die aus oxydierten "Hülsen ohne Trypsin" durch Kochen in 1% SDS ohne vorherige Lysozymbehandlung isoliert wurden. Solche Sacculi enthalten noch "oxydierbare Proteine"; diese konnten in Anwesenheit von Mercaptoäthanol mit heißem SDS extrahiert und elektrophoretisch nachgewiesen werden. Durch Behandlung der Sacculi mit Trypsin wurde das Bandenmuster grundlegend verändert: alle Banden, die den Oxydationsproteinen entsprechen, verschwanden und Bande IV trat in Erscheinung. Diese stellte offensichtlich den Teil des Lipoproteins dar, der zuvor kovalent am Murein gebunden war (13,14) und mit Trypsin leicht abgelöst werden kann (12). Wurde statt des löslichen Enzyms trägergebundenes Trypsin verwendet, so waren genau dieselben Auswirkungen zu beobachten. Mikroskopische Prüfung ergab, daß selbst die kleinsten Partikel des Trägermaterials weit größer als Sacculi waren. Ein enzymatischer Angriff des trägergebundenen Trypsins auf die Innenseite der intakten Sacculi ist also auszu-

schließen. Somit bestehen kaum Zweifel daran, daß die "oxydierbaren Proteine" auf der Außenseite der Sacculi angeordnet waren und folglich der äußeren Membran angehören.

Im Rahmen weiterführender Untersuchungen unter Mitarbeit des Autors (31) wurde gezeigt, daß die Verteilung der "oxydierbaren Proteine" innerhalb der äußeren Membran einen Extremfall asymmetrischer Membranstruktur darstellt. Offenbar befinden sich die "oxydierbaren Proteine" ausschließlich auf der dem umgebenden Medium zugewandten Seite der äußeren Membran (siehe Diskussion).

3.7.4 Anordnung der "oxydierbaren Proteine" in der nativen äußeren Membran

Versuche, aus ganzen Zellen, die mit $CuSO_4$-o-Phenanthrolin behandelt worden waren, SDS-resistente "Oxydationshülsen" zu isolieren, schlugen fehl. Ursache hierfür könnte sein, daß in der Membran durch den Stoffwechsel ein hohes Reduktionspotential aufrecht erhalten werden kann. Aufgrund dieser Überlegung wurden die geernteten Zellen 12 Std. lang unter Belüftung in Minimalmedium mit Dinitrophenol (5) ausgehungert. Dies hat jedoch offensichtlich eine starke

Veränderung der Zellwand zur Folge, denn die ausgehungerten Zellen waren am Ende der Hülsenpräparation dem Lysozym nicht zugänglich. Deshalb wurden stäbchenförmige Zellhüllen nach der Methode von BRAUN et al. (11) isoliert, bei der frisch geerntete Zellen ohne Zugabe von Detergentien oder Chelatbildnern mit Glasperlen aufgebrochen werden. Solche Zellhüllen sind dem Lysozym ohne weitere Behandlung zugänglich. Doch auch sie ließen sich mit $CuSO_4$-o-Phenanthrolin nicht oxydieren; nach Abbau des Mureins lösten sie sich in 1% SDS auf.

Die Tatsache, daß weder ganze Zellen noch Zellhüllen mit $CuSO_4$-o-Phenanthrolin oxydiert werden konnten, schmälert zunächst entscheidend die Aussagekraft der Versuche an "Hülsen ohne Trypsin". Diese könnten Artefakte darstellen und die "oxydierbaren Proteine" in stark veränderter Anordnung enthalten. Denkbar ist jedoch auch, daß die "Oxydationshülsen" die Verhältnisse in der nativen äußeren Membran durchaus widerspiegeln und daß die "oxydierbaren Proteine" nur aufgrund besonderer Erschwernisse nicht oxydativ verknüpft werden können, die ihrerseits in Eigenschaften der Zellwand oder des Kupfer-o-Phenanthrolin-Komplexes begründet liegen. Zwei Beobachtungen deuten darauf hin, daß dies der Fall ist:

1.) Wurde aus Zellen, die nach der Ernte lyophilisiert worden waren, das Phospholipid

mit Chloroform-Methanol extrahiert, so konnten diese mit $CuSO_4$-o-Phenanthrolin oxydiert werden. Durch Lyophilisation ohne Chloroform-Methanol-Extraktion war dieses Ergebnis nicht zu erzielen.

2.) Zellen wurden nach der Ernte mit Trypsin behandelt. Ihre Lebensfähigkeit wurde dadurch nicht beeinträchtigt, eine grundlegende Veränderung der Membranstruktur konnte also nicht erfolgt sein. Trotzdem konnten Hülsen, die aus diesen trypsinisierten Zellen (natürlich ohne weitere Trypsineinwirkung) isoliert wurden, mit $CuSO_4$-o-Phenanthrolin nicht oxydiert werden. SDS-Gelelektrophorese zeigte, daß durch die Trypsinbehandlung einige, bei weitem aber nicht alle und auch nicht die vorherrschenden "oxydierbaren Proteine" abgebaut worden waren (Abb. 22). Ein beschränkter Eingriff in die Struktur der nativen Membran, der nur etwa fünf von ungefähr dreißig "oxydierbaren Proteinen" berührt, die zudem aufgrund ihrer geringen Anzahl von untergeordneter Bedeutung für die Membranstruktur zu sein scheinen, beeinflußt also die vermutlich hochspezifische Anordnung dieser Proteine so nachhaltig, daß eine Oxydation nicht mehr möglich ist.

Im Rahmen weiterer Nachforschungen (31) wurde vor kurzem gezeigt, daß mit Hilfe einer Suspension des wasserunlöslichen Oxydationsmittels Ferricen Zellhüllen oxydiert werden können.

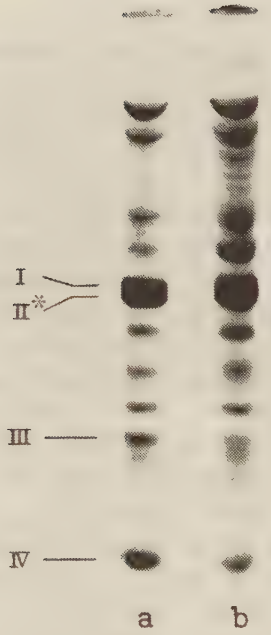


Abb. 22 Trypsinbehandlung ganzer Zellen (siehe 2.2.4).

(a) Ganze Zellen wurden 10 Std. mit Trypsin behandelt und dann der Hülsenpräparation mit Ausnahme des Trypsin-Schritts unterworfen. Die Hülsenproteine wurden in kochendem Probenpuffer (2.3.2) gelöst und durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt.

(b) Kontrolle ohne Trypsineinwirkung

Diese Versuche werden zusammen mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit in der Diskussion (4.4) eingehend erörtert. Obwohl eine direkte Oxydation ganzer Zellen nicht möglich war, weisen die übrigen Beobachtungen insgesamt doch stark darauf hin, daß es sich bei den "Oxydationshülsen" nicht um grob veränderte Kunstprodukte handelt, sondern daß die "oxydierbaren Proteine" auch in der nativen äußeren Membran regelmäßig und geordnet vorliegen.

4. DISKUSSION

4.1 Rundumvernetzung

Die Vorstellung, daß eine Proteinmatrix in der äußeren Membran von E. coli (und wahrscheinlich aller gramnegativen Bakterien) vorliegt, die bei der Verwirklichung der genetisch festgelegten Zellform eine Rolle spielt, stellt eine brauchbare Arbeitshypothese für Untersuchungen zur bakteriellen Morphogenese dar. Sie gründet sich auf folgende Überlegungen und Beobachtungen: Das Murein, verantwortlich vor allem für die mechanische Stabilität der Zellhülle, scheint hinsichtlich der Morphogenese aufgrund fehlender Spezifität nur von sekundärer Bedeutung zu sein (38). Zudem herrschen in der äußeren Membran einige Proteine bei weitem vor; sie kommen als Strukturproteine in Frage. Den ersten direkten Hinweis lieferte die Isolierung von Zellhülsen (35,37), die nur aus Material der äußeren Membran bestehen und auch nach Extraktion des gesamten Phospholipids Zellform beibehalten.

Eine Proteinmatrix, zumal mit formbestimmender Funktion, erfordert gegenseitige Wechselwirkung der Proteine über weite Bereiche der Membran ("long-range order"), wie sie das von CAPALDI und GREEN (16) entwickelte Membranmodell vorsieht. Solche Wechselwirkungen lassen sich experimentell

aber nur schwer nachweisen, z.B. durch Reassoziierungsversuche oder anhand kooperativer Effekte, bei denen eine Einwirkung auf bestimmte Komponenten zu meßbaren Veränderungen anderer Komponenten führt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde deshalb versucht, mit Hilfe quervernetzender Agentien Einblick in die Anordnung der Proteine innerhalb der äußeren Membran von E. coli zu gewinnen. Alle Ergebnisse sprechen dafür, daß die Proteine nicht zufällig verteilt, sondern wohlgeordnet vorliegen, und daß es sich hier um einen Membrantyp handelt, der in extremer Weise dem von CAPALDI und GREEN vorgeschlagenen Modell entspricht.

Ganze Zellen und "Hülsen ohne Trypsin" lassen sich mit Diimidodimethylestern rundum vernetzen. Nach Extraktion mit kochendem 1% SDS erhält man zellförmige Gebilde, die zu 60-70% aus den Hülsenproteinen I, II* und IV (zumindest nach kurzzeitiger Trypsineinwirkung, siehe unten) und zu etwa 20% aus Phospholipid bestehen. Den Rest bilden vor allem Wasser (mindestens 5-10%) und der im Lipoprotein enthaltene Lipidanteil sowie möglicherweise andere Substituenten der Hülsenproteine mit Nicht-Protein-Charakter. Weitere Bestandteile der Zellhülle sind also höchstens in so geringen Mengen enthalten, daß sie für die Aufrechterhaltung der Zellform vernetzter

Hülsen keinesfalls essentiell sein dürften. Im Fall der "Hülsen ohne Trypsin" kann das gesamte Phospholipid vor Vernetzung extrahiert werden. Auf diese Weise entstehen kovalent verknüpfte, fast reine Proteinnetze (80-90%), die Zellform aufweisen.

Da durch Ammonolyse und anschließende SDS-Gelelektrophorese nur die in vernetzten Hülsen vorherrschenden Proteine identifiziert werden konnten, ist nicht auszuschließen, daß auch die in geringer Menge in "Hülsen ohne Trypsin" vorliegenden Proteine (die meisten zählen zu den "oxydierbaren Proteinen") von der Vernetzung betroffen werden. Durch kurzzeitige Trypsineinwirkung konnte jedoch gezeigt werden, daß sie für die Rundumvernetzung nicht erforderlich sind; die Hülsenproteine I, II* und IV können somit als eigentliche Bausteine der rundumvernetzten Hülsen gelten. Die Herkunft der bei Ammonolyse vernetzter ganzer Zellen auftretenden Bande X konnte nicht eindeutig geklärt werden. Sie stellt entweder ein Bruchstück von I oder II* dar - daß solche Spaltprodukte während der Ammonolyse entstehen, haben Kontrollversuche gezeigt - oder aber es handelt sich um ein weiteres Protein der äußeren Membran, das bei Behandlung der ganzen Zellen mit Diimidoestern quervernetzt wird und deshalb während der Hülsenpräparation nicht mehr wie sonst üblich abgelöst werden kann.

Daß trypsinisierte Hülsen nicht rundum quervernetzt werden können, beruht offensichtlich auf der bei Trypsinbehandlung erfolgenden Spaltung von II*. II* zeigte sich resistenter gegenüber Trypsin als die "oxydierbaren Proteine". Das Auftauchen des tryptischen Fragments II, beginnend etwa nach 1 Std. Trypsineinwirkung, ging Hand in Hand mit einer Verminderung der Ausbeute an formstabilen Hülsen nach der sich anschließenden Vernetzung. Dieser Befund steht in Einklang mit der Annahme, daß I und II* in der äußeren Membran in einem bestimmten Muster als sich wiederholende Untereinheiten ("repeating subunits") angeordnet sind. Protein I liegt möglicherweise in Form trimerer Komplexe vor (siehe 4.2), die untereinander nur über Protein II* verknüpft werden können. Sobald in einer einzelnen Hülse die Zahl der Polypeptidketten II* deutlich von den üblichen stöchiometrischen Verhältnissen abweicht, ist Rundumvernetzung nicht mehr möglich.

Die Rundumvernetzung von ganzen Zellen und "Hülsen ohne Trypsin" kann mit Diimidodimethylestern verschiedener Kettenlänge erfolgen. Geprüft wurden die Derivate der Malon-, Bernstein-, Adipin-, Kork- und Sebacinsäure. Es darf wohl angenommen werden, daß dabei dieselben Vernetzungsprodukte entstehen: Morphologische Erscheinung der vernetzten Hülsen und Ausbeute glichen sich in allen

Fällen. Außerdem führte die Teilvernetzung von trypsinisierten Hülsen unabhängig von der Kettenlänge des verwendeten Vernetzungsmittels stets zu denselben Vernetzungskomplexen (in Teil 3 nicht beschriebene Versuche).

Die von den geprüften Vernetzungsmitteln bei gestreckter Konformation überspannten Entfernungen liegen etwa zwischen 0,4 und 1,2 nm. Die Vernetzung erfolgt also wahrscheinlich jeweils über verschiedene Aminogruppen, die den erforderlichen Abstand voneinander aufweisen. Besondere Beachtung verdient, daß eine Ringsumvernetzung mit Malonsäurediimidodimethylester überhaupt zustande kommt, denn dies setzt Berührung oder kürzeste Abstände zwischen den verschiedenen Membranproteinen an zumindest einigen Punkten ihrer Oberfläche voraus und zwar über die gesamte Membranfläche hinweg. Die Permeabilitätseigenschaften der äußeren Membran schließen eine dichte Packung der Proteine mit gleichmäßigen Abständen von etwa 0,4 nm aus. Ein schwammähnliches Proteingerüst dagegen könnte trotz intensiver Wechselwirkung der Polypeptide Zwischenräume aufweisen, durch die der Ein- und Austritt von Metaboliten erfolgen könnte. Denkbar ist auch, daß die Proteine nicht gleichmäßig über die gesamte Zelloberfläche verteilt vorliegen, sondern daß sich Bereiche mit dichter und solche mit aufgelockerter Proteinpackung abwechseln.

Bei den bisherigen Überlegungen wurde eine laterale Diffusion der Membranproteine nicht in Betracht gezogen. Noch ist nicht bekannt, ob die Proteine in der äußeren Membran von E. coli entlang der Lipid-Doppelschicht überhaupt beweglich sind, doch würde eine solche Beweglichkeit jede aufgrund von Vernetzungsversuchen getroffene Aussage über Proteinabstände in Frage stellen. Deshalb wurden die Versuche zur Rundumvernetzung auch bei Temperaturen von $4^{\circ}C$ und $-10^{\circ}C$ durchgeführt, um eine Diffusion soweit als möglich auszuschließen. Verschiedene Untersuchungen an künstlichen Membranen (Referenzen siehe (83)) ließen erkennen, daß die Kohlenwasserstoffketten in Phospholipid-Doppelschichten unterhalb einer bestimmten Phasenübergangstemperatur T_t in all-trans-Konformation und streng hexagonal angeordnet vorliegen. Bei Erhöhung der Temperatur über T_t hinaus treten cis-Konformationen auf, die das regelmäßige Kristallgitter stören. Dieser Übergang von der kristallinen zur flüssig-kristallinen Phase läßt sich anhand zahlreicher physikalischer Methoden verfolgen. Durch ESR-Messungen wurde gezeigt, daß in die Membran eingelagerte Steroid-Moleküle bei Temperaturen oberhalb T_t rasch seitlich diffundieren, unterhalb T_t jedoch unbeweglich und in "Klustern" zusammengeballt vorliegen. Auch bei Cytoplasmamembran-Präparationen

und ganzen Zellen von E. coli konnte ein Phasenübergang der Phospholipide nachgewiesen werden (z.B. 24,64,85). Die Ergebnisse stimmen mit den Beobachtungen an Modell-Membranen weitgehend überein. Unterhalb der Phasenübergangstemperaturen, die in jedem Fall beträchtlich über 4°C lagen, ist die laterale Diffusion der Lipidmoleküle zumindest drastisch eingeschränkt.

Ein möglicher Einwand gegen die Aussagekraft der Untersuchungen zur Rundumvernetzung konnte durch die Versuche bei erniedrigter Temperatur nicht völlig ausgeräumt werden: Unterhalb der Phasenübergangstemperatur könnte eine Vernetzung dadurch ermöglicht werden, daß ausgedehnte proteinfreie Lipidkristalle entstehen und die Membranproteine zusammendrängen. Diese Erwägung beruht auf elektronenmikroskopischen Untersuchungen unter anderem an Erythrocyten (65) und Membranen von Acholeplasma laidlawii (46) und Streptococcus faecalis (84). Tiefgefrorene Membranen zerbrechen bei mechanischer Beanspruchung vielfach entlang der mittleren Lipidschicht (9). So werden die Innenflächen elektronenmikroskopisch zugänglich. Sie sind meist mit runden Partikeln besetzt, die wahrscheinlich Membranproteine darstellen (66). Während diese Partikel oberhalb der Phasenübergangstemperatur gleichmäßig verteilt vorliegen, sind bei Tempe-

raturen darunter partikelfreie Flecken ("patches") zu erkennen. Hierbei handelt es sich wohl um Lipidkristalle, die während ihres Wachstums die Membranproteine zur Seite weggedrängt haben. Daß die Rundumvernetzung oberhalb von T_t nur durch ausgedehnte Lateraldiffusion und darunter nur durch Zusammendrängen der Membranproteine aufgrund einer Lipidkristallbildung ermöglicht werden sollte, erscheint aber nicht sehr wahrscheinlich, da die Vernetzungsreaktionen unter beiden Versuchsbedingungen was Morphologie der vernetzten Hülsen und Ausbeute anbelangt, völlig übereinstimmten.

TSIEN und HIGGINS (84) berichten allerdings auch, daß im Bereich der Phasenübergangstemperatur größere Flecken proteinfreien Lipids entstehen als bei Temperaturen weit darunter. Sie argumentieren, daß im einen Fall noch genügend Lateraldiffusion herrsche, um eine Phasentrennung zu ermöglichen, im anderen Fall dagegen nicht. Die Verhältnisse sind also zu kompliziert, um eine geringe Lateralbewegung der Proteine in der äußeren Membran von E. coli bei den gewählten Vernetzungstemperaturen mit Sicherheit auszuschließen. Immerhin muß aber bedacht werden, daß auch Chloroform-Methanol-extrahierte Hülsen rundum quervernetzt werden können, die kein Lipid mehr enthalten. Ob eine Lateral-

4.2 Teilvernetzung von Präparationen des Stammes 3282

Die in Abschnitt 3.3 beschriebenen Versuche, bei denen ganze Zellen, "Hülsen ohne Trypsin", trypsinisierte sowie Pronase-behandelte Hülsen von Stamm 3282 teilvernetzt wurden, sind zusammenfassend zu beurteilen, da sie sich in ihrer Aussage ergänzen. Werden trypsinisierte Hülsen mit Diimidoestern behandelt, so kommt die Reaktion auf der Stufe mehrere oligomerer Vernetzungskomplexe zum Stillstand. Dieselben Komplexe treten bei Rundumvernetzung von ganzen Zellen und "Hülsen ohne Trypsin" als Zwischenprodukte in Erscheinung. Offensichtlich durch Verknüpfung über intakte Polypeptidketten II* werden sie dort aber bei fortschreitender Reaktion in die Rundumvernetzung einbezogen. Die aufgrund der Trypsinkinetik erkannte Schlüsselrolle von Protein II* äußert sich auch in unterschiedlichem Vernetzungsverhalten von II* und II. Während vor dem Trypsinschritt die Zahl der unvernetzt gebliebenen Polypeptidketten II* mit steigender Vernetzungsmittel-Konzentration rasch und mit etwa gleicher Rate wie I abnimmt, wird das tryptische Fragment II in weit geringerem Ausmaß von der Vernetzung betroffen. Selbst bei hohen Vernetzungsmittel-Konzentrationen bleibt etwa die Hälfte davon unvernetzt.

Polypeptid III wurde in keinem der untersuchten Fälle von der Vernetzung betroffen. Diese Beobachtung erhielt besondere Bedeutung im Rahmen der Ammonolyse von rundum vernetzten Zellen. Sie deutet darauf hin, daß es sich bei dem anfärbbaren Material, das dort im Bereich der Bande III auftrat, um Spaltprodukte wahrscheinlich von II* handeln muß, die während der Ammonolyse entstehen.

Von den Vernetzungskomplexen wurden nur die drei prominentesten näher untersucht. Im Zusammenhang mit den Versuchsergebnissen wurde eingehend dargelegt, warum als einziger Bestandteil der Komplexe (a), (b) und (c) mit Proteincharakter Polypeptid I in Frage kommt. Aufgrund dieser Einschränkung berechtigt die Bestimmung der scheinbaren Molekulargewichte zu der Aussage, daß Komplex (a) wohl aus drei, Komplex (c) aus zwei Polypeptidketten besteht. Das hinsichtlich der elektrophoretischen Beweglichkeit anormale Verhalten von (b) könnte Folge einer Vernetzung von Protein I mit einer Komponente des Lipopolysaccharids sein.

Unlängst hat INOUYE (44) ein Modell zur Organisation des Lipoproteins innerhalb der äußeren Membran vorgestellt. Das Lipoprotein enthält ausgedehnte α-helikale Bereiche. Trägt man die bekannte Aminosäuresequenz in

einem helikalen Gitter auf, so zeigt sich, daß alle hydrophoben Aminosäuren in einem schmalen Band gruppiert sind, das sich im Winkel von etwa 6° zur Längsachse um den von der Helix gebildeten Zylinder windet. Denkbar ist nun, daß mehrere Lipoprotein-Moleküle in Form einer Superhelix so umeinander gewunden sind, daß alle hydrophoben Bereiche nach außen weisen und innen ein Hohlraum entsteht, der mit hydrophilen Aminosäuren ausgekleidet wäre. Die geringste innere Spannung bei maximaler Wechselwirkung ergibt sich unter Annahme von sechs Lipoprotein-Molekülen in einem solchen Komplex. Die Versuche zur Teilvernetzung widersprechen diesem Modell nicht, bestätigen es aber auch nicht ausdrücklich. Neben den Banden (a), (b) und (c) treten zwar weitere Vernetzungsbanden auf, die Lipoprotein (siehe Abb. 8) und somit möglicherweise auch Oligomere davon enthalten. Doch gemessen an Bande IV ist ihre Farbintensität ausnahmslos sehr gering. Sollten die Lipoprotein-Moleküle in einem Komplex wie dem vorgeschlagenen der Vernetzung zugänglich sein, wäre eine prominente Bande zumindest im Molekulargewichtsbereich des Hexameren zu erwarten.

4.3 Weitere Vernetzungsversuche mit Diimidoestern und Glutaraldehyd

Sehr interessant erschien die Frage, ob Abwandlungen der Zellform von Veränderungen im Gefüge der Proteine in der äußeren Membran begleitet werden. Durch Teilvernetzung trypsinisierter Hülsen von Minizellen des Stammes P678-54 und kugeligen Zellen der Mutante lss12 mit Diimidoestern konnten solche Veränderungen nicht festgestellt werden. In beiden Fällen traten die bekannten Vernetzungskomplexe auf. Eine Vernetzung mit Diimidoestern stellt aber möglicherweise nicht das geeignete Instrument dar, um geringe Abweichungen aufzudecken, zumal an der Oberfläche der Proteine offenbar verschiedene zur Vernetzung geeignete Gruppen zur Verfügung stehen. Die Ursache einer scheinbaren Trypsin-Resistenz der Minizellen ist wahrscheinlich in einer verringerten Zugänglichkeit gegenüber den ersten beiden Schritten der Hülsenpräparation zu suchen, denn die Hülsen von Minizellen erschienen im Phasenkontrastmikroskop stets sehr dunkel. Entsprechende Unterschiede zwischen Zellwandbruchstücken von Stäbchen- und Minizellen, die durch Ultraschall-Behandlung gewonnen wurden, waren nicht festzustellen.

Die Vernetzungsversuche mit Glutaraldehyd bildeten den Ausgangspunkt dieser Arbeit. Sie wurden abgebrochen, als sich die Diimido-

ester als brauchbarere Vernetzungsmittel erwiesen, da die Reaktion mit Glutaraldehyd, was überbrückbare Entfernung und Reaktionspartner anbelangt, weniger spezifisch ist. Auch können die Vernetzungsprodukte höchstens durch protein-chemische Methoden identifiziert werden. Immerhin ist bemerkenswert, daß mit Glutaraldehyd auch trypsinisierte Hülsen rundum vernetzt werden können und daß dabei alle Hülsenproteine einbezogen werden. Für eine regelmäßige Anordnung der Hülsenproteine spricht, daß im wesentlichen nur zwei Zwischenprodukte niederen Molekulargewichts auftauchen. Würden alle Möglichkeiten dimerer Verknüpfung verwirklicht, müßte sich dies in einer Vielzahl von Vernetzungsbanden äußern.

4.4 "Oxydierbare Proteine"

Daß etwa 30 Proteine der äußeren Membran von E. coli unabhängig von den zahlenmäßig bei weitem überwiegenden Hülsenproteinen I-IV oxydativ zu einem Netzwerk verknüpft werden können, das auch in kochendem 1% SDS Zellform beibehält, ist wohl das erstaunlichste Ergebnis der vorliegenden Arbeit. Allerdings gelang mit o-Phenanthrolin weder eine Oxydation ganzer Zellen, noch von Zellhüllen, die durch Aufbrechen intakter Zellen mit Glasperlen her-

gestellt worden waren. Es drängte sich deshalb die Frage auf, ob die "Oxydationshülsen" nicht Artefakte darstellen, die keinerlei Rückschlüsse auf die Proteinanordnung in der äußeren Membran erlauben. Ein schlüssiger Beweis, daß die "oxydierbaren Proteine" auch in der nativen Membran ein entsprechendes Netzwerk bilden, konnte nicht erbracht werden. Die zusammenfassende Beurteilung der Befunde dieser Arbeit sowie der Ergebnisse, die im Rahmen weiterführender Untersuchungen (31) erzielt wurden, deuten aber darauf hin, daß nicht erst grobe Veränderungen in der Membranstruktur die Verknüpfung der "oxydierbaren Proteine" ermöglichen.

Aus Tabelle 3 ist zu ersehen, welche Vorbehandlung der Zellen eine erfolgreiche Oxydation mit den geprüften Oxydationsmitteln ermöglicht. Da mit Ferricyanid "Hülsen ohne Trypsin" nicht oxydiert werden konnten (31), wurde vermutet, daß die Löslichkeits-Eigenschaften der Oxydationsmittel ein ausschlaggebender Faktor sein könnten. Deshalb wurde auch das lipophilere Ferrocen geprüft (39), das in Aceton gelöst jeweils vor Anwendung in wässriger Ferricyanid-Lösung suspendiert wurde. Neben "Hülsen ohne Trypsin" konnten damit auch Zellhüllen oxydiert werden. Die Oxydation ganzer Zellen sollte nur als Ergänzung zu den übrigen Versuchen gewertet werden, denn das Ferricen kann sicherlich nicht vollständig aus der Zellwand herausge-

Oxydationsmittel Aufarbeitungsstufe der behandelten Zellen	Ferricyanid	$CuSO_4$-o-Phenanthrolin	Ferricyanid-Ferricen
"Hülsen ohne Trypsin"	-	+	+
Zellhüllen	-	-	+
Ganze Zellen in Rohrzucker	-	-	+/-
Ganze Zellen in Rohrzucker + Triton X-100	-	-	+
Lyophilisierte Zellen	0	-	0
Lyophilisierte Zellen nach Chloroform-Methanol-Extraktion	0	+	0

Tab. 3: Abhängigkeit der Ausbeute an SDS-resistenten "Oxydationshülsen" von Vorbehandlung der Zellen und verwendetem Oxydationsmittel. Nach (31).

(+) Oxydation mit guter Ausbeute möglich; (+/-) Oxydation nur mit geringer Ausbeute möglich; (-) Oxydation nicht möglich; (0) nicht geprüft.

waschen werden und somit seine Wirkung auch während der anschließenden Rohrzucker-Einwirkung entfalten, die notwendig ist, um das Murein dem Lysozym zugänglich zu machen. So mag auch verständlich werden, daß bei Verwendung von Triton X-100 die Oxydation ganzer Zellen mit guter Ausbeute, ohne Detergens dagegen nur mit geringer Ausbeute möglich war.

In den "Oxydationshülsen" kommt durchschnittlich ein Cystein auf einen Proteinanteil von etwa 8 000 Dalton Molekulargewicht. Man karn deshalb wohl davon ausgehen, daß eine großflächige Verknüpfung der "oxydierbaren Proteine" nicht bei jeder zufälligen Verteilung dieser Proteine in der äußeren Membran möglich ist, sondern daß sie eine vermutlich hochspezifische Anordnung voraussetzt. Werden ganze Zellen mit Trypsin behandelt, so wird ihre Lebensfähigkeit nicht beeinträchtigt. Trotzdem können die daraus isolierten "Hülsen ohne Trypsin" nicht mehr oxydiert werden, offensichtlich allein deshalb, weil bei Trypsineinwirkung etwa fünf, mengenmäßig nicht sehr ins Gewicht fallende "oxydierbare Proteine" verdaut werden. Daß ein so beschränkter Eingriff in die Struktur der nativen Membran zum Verlust der Oxydierbarkeit führt, spricht zusammen mit den in Tabelle 3 aufgeführten Versuchen stark für eine ähnliche Anordnung der "oxydierbaren Proteine" in nativer Membran und "Hülsen ohne Trypsin". Über Berührungspunkte zwischen

den "oxydierbaren Proteinen" in der nativen Membran, wie sie bei Bildung von Disulfidbrücken vorausgesetzt werden können, ist damit allerdings nichts ausgesagt.

Die "oxydierbaren Proteine" sind Bestandteile der äußeren Membran. Sie werden verdaut bei Einwirkung von trägergebundenem Trypsin auf Murein-Sacculi, die aus oxydierten "Hülsen ohne Trypsin" isoliert wurden, obwohl die Trägerpartikel aufgrund ihrer Größe nicht in die Sacculi eindringen können. Die in (31) beschriebenen Versuche zeigen, daß sie in der äußeren Membran wahrscheinlich asymmetrisch angeordnet sind und zwar an der dem Außenmedium zugekehrten Oberfläche. Aminosäure-Analysen ergaben nämlich, daß trägergebundenes Trypsin zwar bei Murein-Sacculi, nicht aber bei "Hülsen ohne Trypsin" das Lipoprotein vom Murein abzuspalten vermag, offensichtlich also die äußere Membran nicht durchdringen kann. Trotzdem werden die "oxydierbaren Proteine" auch bei Behandlung von "Hülsen ohne Trypsin" mit trägergebundenem Trypsin vollständig abgebaut.

Die Anzahl der "oxydierbaren Proteine" wurde anhand der Elektrophorese-Gele auf etwa 30 geschätzt. Da die Bandenmuster bei allen Präparationen von "Oxydationshülsen" bemerkenswert gut übereinstimmten, unabhängig davon, ob diese aus "Hülsen ohne Trypsin", Chloroform-Methanol-extrahierten

Zellen, Zellhüllen oder ganzen Zellen mit $CuSO_4$-o-Phenanthrolin (soweit geeignet) oder mit Ferricyanid-Ferricen (31) gewonnen worden waren, sollten damit zumindest alle in entsprechender Menge vorhandenen "oxydierbaren Proteine" erfaßt sein.

Bei weiteren Untersuchungen steht hinsichtlich der Hülsenproteine I-IV wohl die Frage nach der bakteriellen Morphogenese im Vordergrund. Die "oxydierbaren Proteine" dagegen dürften wohl weniger als spezifische Produkte der genetischen Information über die Zellform gelten. Hier werden weitere Nachforschungen sicherlich in eine andere Richtung weisen: Sollten sich die "oxydierbaren Proteine" in der nativen Membran ebenso wie in "Hülsen ohne Trypsin" berühren, könnten sie ein ausgedehntes Kommunikationssystem bilden. Zumindest darf angenommen werden, daß eine so spezifische Anordnung unterschiedlicher Proteine einen Zweck erfüllt, der sich wohl kaum in den strukturbedingten Funktionen der Einzelbausteine erschöpfen wird.

5. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde die Organisation der Proteine in der äußeren Membran von Escherichia coli K12 mit Hilfe quervernetzender Agentien untersucht.

1.) Ganze Zellen und Zellhülsen (37), die nicht mit Trypsin behandelt worden waren, konnten mit Dicarbonsäurediimidodimethylestern verschiedener Kettenlänge rundum quervernetzt werden. Nach Extraktion mit kochendem 1% Natriumdodecylsulfat behielten sie Zellform bei und bestanden zu 60-70% (vom Trockengewicht nach Lyophilisation) aus Protein, hauptsächlich aus den Hülsenproteinen I, II* und IV. Die zahlreichen Proteine, die nur in geringer Menge in nicht Trypsin-behandelten Hülsen vorliegen, sind für die Rundumvernetzung nicht erforderlich. Die bei Trypsineinwirkung erfolgende Spaltung von Polypeptid II* ist offenbar Ursache dafür, daß trypsinisierte Hülsen nicht rundum quervernetzt werden konnten. Im Fall der "Hülsen ohne Trypsin" konnte das gesamte Phospholipid vor Vernetzung extrahiert werden. Durch Vernetzung der Phospholipid-freien Hülsen entstanden kovalent geschlossene, fast reine Proteinnetze (80-90% Protein), die Zellform aufwiesen. Den Großteil der Nicht-Protein-Bestandteile bildete ein restlicher Wassergehalt von mindestens 5-10%. Die Vernetzung

wurde außer bei Raumtemperatur auch bei 4°C und -10°C vorgenommen, um eine Lateraldiffusion der Membranproteine soweit möglich auszuschließen.

2.) Bei Vernetzung trypsinisierter Hülsen kommt die Reaktion auf der Stufe oligomerer Vernetzungsprodukte zum Stillstand. Diese treten auch bei Rundumvernetzung von ganzen Zellen und "Hülsen ohne Trypsin" als Zwischenprodukteauf. Drei mengenmäßig vorherrschende Vernetzungskomplexe wurden näher untersucht. Zwei konnten mit hoher Wahrscheinlichkeit als Dimere bzw. Trimere von Polypeptid I identifiziert werden, der dritte entsteht möglicherweise durch Vernetzung von Polypeptid I mit einer Nicht-Protein-Komponente, z.B. einem Bestandteil des Lipopolysaccharids.

3.) Eine grundlegend veränderte Protein-Anordnung in der äußeren Membran der E. coli-Mutanten lss12, die bei 42°C in Form von Kugeln wächst, und in der äußeren Membran von Minizellen des Stammes P678-54 konnte durch Vernetzung mit Diimidoestern nicht festgestellt werden. Zellwandbruchstücke von Mini- und Stäbchenzellen unterschieden sich hinsichtlich ihrer Proteinzusammensetzung nur unwesentlich.

4.) Mit Glutaraldehyd konnten auch trypsinisierte Zellhülsen rundum quervernetzt werden. Die Vernetzung verlief über oligomere Zwi-

schenprodukte und ergab Natriumdodecylsulfat-resistente, im Phasenkontrastmikroskop nur undeutlich erkennbare Partikel. Elektronenmikroskopische Prüfung zeigte, daß es sich dabei hauptsächlich um Bruchstücke handelte, von denen allerdings ein beträchtlicher Anteil als Hälften stäbchenförmiger Hülsen identifiziert werden konnte.

5.) Durch Behandlung von "Hülsen ohne Trypsin" mit $CuSO_4$-o-Phenanthrolin konnten die meisten der vor Trypsineinwirkung in der Hülsenmembran in geringer Menge vorliegenden Proteine (etwa 30 verschiedene) durch Disulfidbrücken kovalent miteinander verknüpft werden. Bei Extraktion mit kochendem Natriumdodecylsulfat entstanden zellförmige, fast reine Proteinnetze (80-90% Protein), die sich nach Zugabe eines Reduktionsmittels oder unter Einwirkung von Trypsin auflösten. Die Hülsenproteine I-IV zählen nicht zu den "oxydierbaren Proteinen", deren Vorkommen sich offensichtlich auf die äußere Membran beschränkt. Obwohl eine gegenseitige Berührung der "oxydierbaren Proteine" in der nativen Membran nicht nachgewiesen werden konnte, sprechen die Versuche dieser Arbeit zusammen mit weiteren Ergebnissen (31), auf die in der Diskussion eingegangen wird, für die Annahme, daß die "oxydierbaren Proteine" in Hülsenmembran und nativer Membran zumindest ähnlich angeordnet sind.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1 ADLER, H.I., W.D. FISHER, A. COHEN, and A.A. HARDIGREE: Miniature Escherichia coli cells deficient in DNA.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 57, 321-326 (1967)

2 BANKER, G.A., and C.W. COTMAN: Measurement of free electrophoretic mobility and retardation coefficient of protein-sodium dodecyl sulfate complexes by gel electrophoresis. A method to validate molecular weight estimates.
J. Biol. Chem. 247, 5856-5861 (1972)

3 BEISENHERZ, G., H.J. BOLTZE, T. BÜCHER, R. CZOK, K.H. GARBADE, E. MEYER-ARENDT und G. PFLEIDERER: Diphosphofructose-Aldolase, Phosphoglyceraldehyd-Dehydrogenase, Milchsäure-Dehydrogenase, Glycerophosphat-Dehydrogenase und Pyruvat-Kinase aus Kaninchenmuskulatur in einem Arbeitsgang.
Z. Naturforsch. 8b, 555-577 (1953)

4 BELL, R.M., R.D. MAVIS, M.J. OSBORN, and P.R. VAGELOS: Enzymes of phospholipid metabolism: Localization in the cytoplasmic and outer membrane of the cell envelope of Escherichia coli and Salmonella typhimurium.
Biochim. Biophys. Acta 249, 628-635 (1971)

5 BERGER, E.A.: Different mechanisms of energy coupling for the active transport of proline and glutamine in Escherichia coli.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 70, 1514-1518 (1973)

6 BICKLE, T.A., J.W.B. HERSHEY, and R.R. TRAUT: Spatial arrangement of ribosomal proteins: Reaction of the Escherichia coli 30S subunit with bis-imidoesters.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 69, 1327-1331 (1972)

7 BIRDSELL, D.C., and E.H. COTA-ROBLES: Lysis of spheroplasts of Escherichia coli by a non-ionic detergent. Biochem. Biophys. Res. Commun. 31, 438-446 (1968)

8 BRAGG, P.D., and C. HOU: Organization of proteins in the native and reformed outer membrane of Escherichia coli. Biochim. Biophys. Acta 274, 478-488 (1972)

9 BRANTON, D.: Fracture faces of frozen membranes. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 55, 1048-1056 (1966)

10 BRAUN, V., and V. BOSCH: Repetitive sequences in the murein-lipoprotein of the cell wall of Escherichia coli. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 69, 970-974 (1972)

11 BRAUN, V., H. GNIRKE, U. HENNING, and K. REHN: Model for the structure of the shape-maintaining layer of the Escherichia coli cell envelope. J. Bacteriol. 114, 1264-1270 (1973)

12 BRAUN, V., and K. REHN: Chemical characterization, spatial distribution and function of a lipoprotein (murein-lipoprotein) of the E. coli cell wall. The specific effect of trypsin on the membrane structure. Eur. J. Biochem. 10, 426-438 (1969)

13 BRAUN, V., and U. SIEGLIN: The covalent murein-lipoprotein structure of the Escherichia coli cell wall. The attachment site of the lipoprotein on the murein. Eur. J. Biochem. 13, 336-346 (1970)

14 BRAUN, V., and H. WOLFF: The murein-lipoprotein linkage in the cell wall of Escherichia coli. Eur. J. Biochem. 14, 387-391 (1970)

15 BURTON, A.J., and H.E. CARTER: Purification and characterization of the lipid A component of the lipopolysaccharids from Escherichia coli. Biochem. 3, 411-418 (1964)

16 CAPALDI, R.A., and D.E. GREEN: Membrane proteins and membrane structure. FEBS Letters 25, 205-209 (1972)

17 CARPENTER, F.H., and K.T. HARRINGTON: Intermolecular cross-linking of monomeric proteins and cross-linking of oligomeric proteins as a probe of quaternary structure. Application to leucine aminopeptidase (bovine lens). J. Biol. Chem. 247, 5580-5586 (1972)

18 CHANG, F.N., and J.G. FLAKS: The specific cross-linking of two proteins from the Escherichia coli 30s ribosomal subunit. J. Mol. Biol. 68, 177-180 (1972)

19 CREIGHTON, T.E., and C. YANOFSKY: Association of the α and B_2 subunits of the tryptophan synthetase of Escherichia coli. J. Biol. Chem. 241, 980-990 (1966)

20 DANIELLI, J.F., and H. DAVSON: A contribution to the theory of permeability of thin films. J. Cell. and Comp. Physiol. 5, 495-508 (1935)

21 DAVIES, G.E., and G.R. STARK: Use of dimethyl suberimidate, a cross-linking reagent, in studying the subunit structure of oligomeric proteins. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 66, 651-656 (1970)

22 DE PAMPHILIS, M.L., and J. ADLER: Attachment of flagellar basal bodies to the cell envelope: Specific attachment to the outer, lipopolysaccharide membrane and the cytoplasmic membrane. J. Bacteriol. 105, 396-407 (1971)

23 DE PETRIS, S.: Ultrastructure of the cell wall of Escherichia coli and chemical nature of its constituent layers. J. Ultrastruct. Res. 19, 45-83 (1967)

24 ESFAHANI, M., A.R. LIMBRICK, S. KNUTTON, T. OKA, and S.J. WAKIL: The molecular organization of lipids in the membrane of Escherichia coli: Phase transitions. Proc. Nat. Acad.Sci. USA 68, 3180-3184 (1971)

25 GARTEN, W., Dissertation Tübingen, in Vorbereitung

26 Garten, W., and U. HENNING: Cell envelope and shape of Escherichia coli K12. Isolation and preliminary characterization of the major ghost-membrane proteins. Eur. J. Biochem. 47, 343-352 (1974)

27 GORDESKY, S.E., and G.V. MARINETTI: The asymmetric arrangement of phospholipids in the human erythrocyte membrane. Biochem. Biophys. Res. Commun. 50, 1027-1031 (1973)

28 GORDESKY, S.E., G.V. MARINETTI, and G.B. SEGEL: Differences in the reactivity of phospholipids with 1-fluoro 2,4-dinitrobenzene in normal red blood cells, sickle cells and red blood cell ghosts. Biochem. Biophys. Res. Commun. 47, 1004-1009 (1972)

29 GURD, F.R.N.: Carboxymethylation; in "Methods in enzymology" (C.H.W. Hirs, ed.), Vol. XI, p. 532-541, Acadmic Press, New York, 1967

30 HABEEB, A.F.S.A., and R. HIRAMOTO: Reaction of proteins with glutaraldehyde. Arch. Biochem. Biophys. 126, 16-26 (1968)

31 HALLER, I., B. HÖHN, and U. HENNING, in Vorbereitung

32 HANTKE, K., and V. BRAUN: Covalent binding of lipid to protein. Diglyceride and amide-linked fatty acid at the N-terminal end of the murein-lipoprotein of the Escherichia coli outer membrane. Eur. J. Biochem. 34, 284-296 (1973)

33 HARTMAN, F.C., and F. WOLD: Cross-linking of bovine pancreatic ribonuclease A with dimethyl adipimidate. Biochem. 6, 2439-2448 (1967)

34 HENNING, U., G. DENNERT, K. REHN, and G. DEPPE: Effects of oleate starvation in a fatty acid auxotroph of Escherichia coli K12. J. Bacteriol. 98, 784-796 (1969)

35 HENNING, U., B. HÖHN, and I. SONNTAG: Cell envelope and shape of Escherichia coli K12. The ghost membrane. Eur. J. Biochem. 39, 27-36 (1973)

36 HENNING, U., K. REHN, V. BRAUN, B. HÖHN, and U. SCHWARZ: Cell envelope and shape of Escherichia coli K12. Properties of a temperature-sensitive rod mutant. Eur. J. Biochem. 26, 570-586 (1972)

37 HENNING, U., K. REHN, and B. HÖHN: Cell envelope and shape of Escherichia coli K12. Proc. Nat. Acad.Sci. USA 70, 2033-2036 (1973)

38 HENNING, U., and U. SCHWARZ: Determinants of cell shape; in "Bacterial membranes and walls" (L. Leive, ed.), p. 413-438, M. Dekker, New York, 1973

39 HINKLE, P.: A model system for mitochondrial ion transport and respiratory control. Biochem. Biophys. Res. Commun. 41, 1375-1381 (1970)

40 HIRASHIMA, A., H.C. WU, P.S. VENKATESWARAN, and M. INOUYE: Two forms of a structural lipoprotein in the envelope of Escherichia coli. Further characterization of the free form. J. Biol. Chem. 248, 5654-5659 (1973)

41 HIRS, C.H.W.: The oxidation of ribonuclease with performic acid.
J. Biol. Chem. 219, 611-621 (1956)

42 HULLA, F.W., and W.B. GRATZER: Association of high-molecular weight proteins in the red cell membrane.
FEBS Letters 25, 275-278 (1972)

43 HUNTER, M.J., and M.L. LUDWIG: The reaction of imidoesters with proteins and related small molecules.
J. Amer. Chem. Soc. 84, 3491-3504 (1962)

44 INOUYE, M.: A three-dimensional molecular assembly model of a lipoprotein from the Escherichia coli outer membrane.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 71, 2396-2400 (1974)

45 INOUYE, M., J. SHAW, and C. SHEN: The assembly of a structural lipoprotein in the envelope of Escherichia coli.
J. Biol. Chem. 247, 8154-8159 (1972)

46 JAMES, R., and D. BRANTON: Lipid- and temperature-dependent structural changes in Acholeplasma laidlawii cell membranes.
Biochim. Biophys. Acta 323, 378-390 (1973)

47 KANFER, J., and E.P. KENNEDY: Metabolism and function of bacterial lipids. I. Metabolism of phospholipids in Escherichia coli B.
J. Biol. Chem. 238, 2919-2922 (1963)

48 KELLENBERGER, E., and C. KELLENBERGER-VAN DER KAMP: On a modification of the gene product P23 according to its use as subunit of either normal capsids of phage T4 or of polyheads.
FEBS Letters 8, 140-144 (1970)

49 KOBASHI, K., and B.L. HORECKER: Reversible inactivation of rabbit muscle aldolase by o-phenanthroline.
Arch. Biochem. Biophys. 121, 178-186 (1967)

50 KOHLHAW, G., and G. BOATMAN: Cross-linking of Salmonella isopropylmalate synthetase with dimethyl suberimidate: Evidence for antagonistic effects of leucine and acetyl-CoA on the quaternary structure.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 43, 741-746 (1971)

51 KUSHNER, D.J.: Self-assembly of biological structures.
Bacteriol. Rev. 33, 302-345 (1969)

52 LAEMMLI, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.
Nature 227, 680-685 (1970)

53 LUTTER, L.C., and C.G. KURLAND: Reconstitution of active ribosomes with cross-linked proteins.
Nature New Biol. 243, 15-17 (1973)

54 MARINETTI, G.V., BAUMGARTEN, R., SHEELEY, D., and S. GORDESKY: Cross-linking of phospholipids to proteins in the erythrocyte membrane.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 53, 302-308 (1973)

55 McELVAIN, S.M., and J.P. SCHROEDER: Orthoesters and related compounds from malono- and succinonitriles.
J. Amer. Chem. Soc. 71, 40-46 (1949)

56 MIURA, T., and S. MIZUSHIMA: Separation and properties of outer and cytoplasmic membranes in Escherichia coli.
Biochim. Biophys. Acta 193, 268-276 (1969)

57 MOLDOW, C., J. ROBERTSON, and L. ROTHFIELD: Purification of bacterial membrane proteins. The use of guanidinium thiocyanate and urea.
J. Membrane Biol. 10, 137-152 (1972)

58 MURRAY, R.G.E., P. STEED, and H.E. ELSON: The location of the mucopeptide in sections of the cell wall of Escherichia coli and other gram-negative bacteria.
Can. J. Microbiol. 11, 547-560 (1965)

59 NANNINGA, N.: Ultrastructure of the cell envelope of Escherichia coli B after freeze-etching.
J. Bacteriol. 101, 297-303 (1970)

60 OSBORN, M.J.: Studies on the gram-negative cell wall. I. Evidence for the role of 2-keto-3-deoxyoctonate in the lipopolysaccharide of Salmonella typhimurium.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 50, 499-506 (1963)

61 OSBORN, M.J.: Structure and biosynthesis of the bacterial cell wall.
Ann. Rev. Biochem. 38, 501-538 (1969)

62 OSBORN, M.J., GANDER, J.E., and E. PARISI: Mechanism of assembly of the outer membrane of Salmonella typhimurium. Site of synthesis of lipopolysaccharide.
J. Biol. Chem. 247, 3973-3986 (1972)

63 OSBORN, M.J., J.E. GANDER, E. PARISI, and J. CARSON: Mechanism of assembly of the outer membrane of Salmonella typhimurium. Isolation and characterization of the cytoplasmic and outer membrane.
J. Biol. Chem. 247, 3962-3972 (1972)

64 OVERATH, P., and H. TRÄUBLE: Phase transitions in cells, membranes, and lipids of Escherichia coli. Detection by fluorescent probes, light scattering, and dilatometry.
Biochem. 12, 2625-2634 (1973)

65 PINTO DA SILVA, P.: Translational mobility of the membrane intercalated particles of human erythrocyte ghosts.
J. Cell Biol. 53, 777-787 (1972)

66 PINTO DA SILVA, P., and D. BRANTON: Membrane intercalated particles: The plasma membrane as a planar fluid domain.
Chem. Phys. Lipids 8, 265-278 (1972)

67 QUIOCHO, F.A., and F.M. RICHARDS: Intermolecular cross-linking of a protein in the crystalline state: Carboxypeptidase-A.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 52, 833-839 (1964)

68 REYNOLDS, J.A., and C. TANFORD: The gross conformation of protein-sodium dodecyl sulfate complexes. J. Biol. Chem. 245, 5161-5165 (1970)

69 RICHARDS, F.M., and J.R. KNOWLES: Glutaraldehyde as a protein cross-linking reagent. J. Mol. Biol. 37, 231-233 (1968)

70 SABET, S.F., and C.A. SCHNAITMAN: Localization and solubilization of colicin receptors. J. Bacteriol. 108, 422-430 (1971)

71 SALTON, M.R.J.: Structure and function of bacterial cellmembranes. Ann. Rev. Microbiol. 21, 417-442 (1967)

72 SCANDELLA, C.J., and A. KORNBERG: A membrane-bound phospholipase A1 purified from Escherichia coli. Biochem. 10, 4447-4456 (1971)

73 SCHNAITMAN, C.A.: Examination of the protein composition of the cell envelope of Escherichia coli by polyacrylamide gel electrophoresis. J. Bacteriol. 104, 882-889 (1970)

74 SCHNAITMAN, C.A.: Protein composition of the cell wall and cytoplasmic membrane of Escherichia coli. J. Bacteriol. 104, 890-901 (1970)

75 SCHNAITMAN, C.A.: Solubilization of the cytoplasmic membrane of Escherichia coli by Triton X-100. J. Bacteriol. 108, 545-552 (1971)

76 SCHNAITMAN, C.A.: Outer membrane proteins of Escherichia coli. II. Heterogeneity of major outer membrane polypeptides. Arch. Biochem. Biophys. 157, 553-560 (1973)

77 SCHWEIZER, M., Dissertation Tübingen, in Vorbereitung

78 SCHWEIZER, M., I. SONNTAG, and U. HENNING, in Vorbereitung

79 SINGER, S.J., and G.L. NICOLSON: The fluid mosaic model of the structure of cell membranes.
Science 175, 720-731 (1972)

80 STECK, T.L.: Cross-linking the major proteins of the isolated erythrocyte membrane.
J. Mol. Biol. 66, 295-305 (1972)

81 TAMAKI, S., T. SATO, and M. MATSUHASHI: Role of lipopolysaccharides in antibiotic resistance and bacteriophage adsorption of Escherichia coli K-12.
J. Bacteriol. 105, 968-975 (1971)

82 TOMASZ, A.: The bacterial cell surface.
Nature 234, 389-392 (1971)

83 TRÄUBLE, H.: Phase transitions in lipids; in "Biomembranes" (F. Kreuzer and J.F.G. Slegers, eds.), Vol. 3, p. 197-227, Plenum Publishing Corporation, New York, 1972

84 TSIEN, H.C., and M.L. HIGGINS: Effect of temperature on the distribution of membrane particles in Streptococcus faecalis as seen by the freeze-fracture technique.
J. Bacteriol. 118, 725-734 (1974)

85 TSUKAGOSHI, N., and C.F. FOX: Transport system assembly and the mobility of membrane lipids in Escherichia coli.
Biochem. 12, 2822-2829 (1973)

86 VAN HEIJENOORT, J., L. ELBAZ, P. DEZELEE, J.-F. PETIT, E. BRICAS, and J.-M. GHUYSEN: Structure of the meso-diaminopimelic acid containing peptidoglycans in Escherichia coli B and Bacillus megaterium KM.
Biochem. 8, 207-213 (1969)

87 VOGEL, H.J., and D.M. BONNER: Acetylornithinase of Escherichia coli: Partial purification and some properties.
J. Biol. Chem. 218, 97-106 (1956)

88 VOGEL, O., B. HÖHN, and U. HENNING: Molecular structure of the pyruvate dehydrogenase complex from Escherichia coli K12.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 69, 1615-1619 (1972)

89 WEBER, K., and M. OSBORN: The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis.
J. Biol. Chem. 244, 4406-4412 (1969)

90 WEIDEL, W., and H. PELZER: Bagshaped macromolecules - a new outlook on bacterial cell walls.
Advan. Enzymol. 26, 193-232 (1964)

91 WEINER, A.M., T. PLATT, and K. WEBER: Amino-terminal sequence analysis of proteins purified on a nanomole scale by gel electrophoresis.
J. Biol. Chem. 247, 3242-3251 (1972)

92 WELTZIEN, H.U., and M.A. JESAITIS: The nature of the colicin K receptor of Escherichia coli Cullen.
J. Exp. Med. 133, 534-553 (1971)

93 WHITE, D.A., F.R. ALBRIGHT, W.J. LENNARZ, and C.A. SCHNAITMAN: Distribution of phospholipid-synthesizing enzymes in the wall and membrane subfractions of the envelope of Escherichia coli.
Biochim. Biophys. Acta 249, 636-642 (1971)

94 WOOD, W.B., R.S. EDGAR, J. KING, I. LIELAUSIS, and M. HENNINGER: Bacteriophage assembly.
Fed. Proc. Fed. Amer. Soc. Exp. Biol. 27, 1160-1166 (1968)

7. ABKÜRZUNGEN

Neben den gebräuchlichen chemischen Symbolen und Abkürzungen von Maßeinheiten fanden folgende Abkürzungen Verwendung:

Dap	Diaminopimelinsäure
ESR	Elektronenspinresonanz
MG	Molekulargewicht
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl.: Sodium dodecyl sulphate)
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

Lebenslauf

Am 21. Juni 1946 wurde ich als Sohn des technischen Kaufmanns Werner Haller und seiner Ehefrau Edith, geb. Häcker, in Pforzheim geboren. Wohnsitz meiner Eltern war Stuttgart-Bad Cannstatt, wo ich von 1953 bis 1957 die Grundschule und anschließend den Neusprachlichen Zug II (dreisprachig) am Johannes-Kepler-Gymnasium besuchte. Die Reifeprüfung legte ich 1966 ab.

Nach zweijährigem Wehrdienst bei der Bundeswehr nahm ich im Sommersemester 1968 mein Studium der Biologie an der Universität Tübingen auf, das ich 1972 mit dem Diplom abschloß. Hauptfach war Mikrobiologie, Nebenfächer waren Biochemie, Genetik und Organische Chemie; die Diplomarbeit befaßte sich mit der Regulation der Enzymsynthese in Bakterien.

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von Oktober 1972 bis November 1974 unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. U. Henning am Max-Planck-Institut für Biologie in Tübingen.

Meine akademischen Lehrer waren:

D. Ammermann, E. Bayer, E. Bünning,
H. Diekmann, D. Dütting, A. Gierer,
K.G. Grell, P. Hausen, U. Henning,
H. Jokusch, R. Knippers, H. Krüger,
W. Loeffler, K. Mägdefrau, H. Metzner,
G. Mickoleit, F.-P. Möhres, E. Müller,
K.-W. Mundry, A. Rieker, W. Rüdorff,
E. Sander, S. Sarkar, V. Schwartz,
U. Schwarz, W. Schweizer, B. Schwemmle,
W. Seyffert, H. Stegmann, H.B. Strack,
G. Weitzel, K. Wöhrmann, H. Zähner,
K. Zetsche

Druck: SPRINT-DRUCK GmbH
7 Stuttgart 30, Wiener Str. 117
Telefon 81 26 69

Druck: SPRINT-DRUCK GmbH
7 Stuttgart 30, Wiener Str. 117
Telefon 81 26 69